

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen

**Zur Bildung
pektolytischer und cellulolytischer Enzyme
durch Cercospora herpotrichoides Fron**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Umweltsicherung
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Diplomlandwirt Gerd Hänßler
geboren in Langenselbold

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen

**Zur Bildung
pektolytischer und cellulolytischer Enzyme
durch Cercospora herpotrichoides Fron**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Umweltsicherung
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Diplomlandwirt Gerd Hänßler
geboren in Langerselbold

Gießen 1971



Dekan:

Professor Dr. E. Küster

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Großmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Küster

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 9. 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	8
1. <u>Herkunft der Pilzkulturen</u>	8
2. <u>Anzüchtmethoden</u>	9
2.1. Gewinnung von Impfmateriel	9
2.2. Gewinnung der Enzyme	9
3. <u>Bestimmung des Pilzwachstums</u>	10
3.1. Wachstum auf festem Nährsubstrat (Koloniedurchmesser)	10
3.2. Wachstum in Nährlösungen (Myzelrockengewicht)	10
4. <u>Anzüchtmethoden unter veränderten Kulturbedingungen</u>	10
4.1. Vorkultur	10
4.2. Schüttelkultur	11
4.3. Lichteinfluß	11
4.4. Temperatureinfluß	11
5. <u>Bestimmung der pektolytischen Aktivität</u>	11
5.1. Cup-plate-Methode	11
5.2. Viskosimetrische Verfahren	11
5.3. Erfassung reduzierender Gruppen	12
5.4. Nachweis von Transeliminase	13
5.5. Nachweis der Pektinmethylesterase	14
5.6. Chromatographischer Nachweis von Pektin- bzw. Pektat-Abbauprodukten	14
6. <u>Bestimmung der cellulolytischen Aktivität</u>	15
6.1. Bestimmung der C_x -Aktivität	15
6.1.1. Cup-plate-Methode	15
6.1.2. Viskosimetrische Verfahren	15
6.1.3. Erfassung reduzierender Gruppen	16
6.2. Bestimmung der C_1 -Aktivität	16
6.2.1. C_1 -Aktivität in Gegenwart des Pilzes	16
6.2.1.1. Gewichtsverlust von Filtrierpapier	16

	Seite
6.2.1.2. Verlust der Reißfestigkeit von Baumwollfäden	16
6.2.2. C ₁ -Aktivität in zellfreien Kulturfiltraten	17
7. <u>Bestimmung der mazerierenden Fähigkeit der Kulturfiltrate</u>	18
8. <u>Ermittlung der Temperatur- und pH-Stabilität der Enzyme</u>	18
8.1. Temperaturstabilität	18
8.2. pH-Stabilität	18
9. <u>Statistische Auswertung</u>	19
C. <u>Ergebnisse</u>	19
1. <u>Vergleichende Prüfung verschiedener Pilzherkünfte</u>	19
1.1. Myzelwachstum in vitro	19
1.2. Enzymatische Aktivität	21
1.2.1. Cup-plate-Methode	21
1.2.2. Viskosimetrische Methode	21
2. <u>Auffinden einer optimalen Nährlösung</u>	23
2.1. Prüfung verschiedener C-Quellen	23
2.2. Prüfung verschiedener pH-Werte	26
3. <u>Enzymatische Aktivität nach unterschiedlichen Kulturbedingungen</u>	30
3.1. Vorkultur des Inokulums	30
3.2. Einfluß der Kulturdauer	31
3.3. Schüttelkultur	33
3.4. Lichteinfluß	35
3.5. Temperatureinfluß	36
4. <u>Beeinflussung der Aktivität der Kulturfiltrate</u>	40
4.1. Einfluß der Pufferung	40
4.2. Vorbehandlung der Kulturfiltrate	41
5. <u>Charakterisierung der pektolytischen Enzyme</u>	44
5.1. Polygalakturonase (PG)	44
5.1.1. Substratspezifität bei verschiedenen pH-Werten	44
5.1.2. Beeinflussung der PG-Aktivität	47
5.2. Transeliminase (PTE)	48

	Seite
5.2.1. Beeinflussung der PTE-Produktion	49
5.2.2. Beeinflussung der PTE-Aktivität	51
5.3. Pektinmethylesterase (PME)	56
5.3.1. Beeinflussung der PME-Produktion	56
5.3.2. Beeinflussung der PME-Aktivität	58
5.4. Chromatographischer Nachweis von Pektin- bzw. Pektatabbauprodukten	61
6. <u>Cellulolytische Enzyme</u>	62
6.1. C_x -Aktivität	62
6.1.1. Beeinflussung der Enzymaktivität	63
6.2. C_1 -Aktivität	66
6.2.1. C_1 -Aktivität in Gegenwart des Pilzes	67
6.2.2. C_1 -Aktivität zellfreier Kulturfiltrate	74
7. <u>Mazerierende Fähigkeiten der Kulturfiltrate</u>	75
D. <u>Diskussion</u>	77
E. <u>Zusammenfassung</u>	91
F. <u>Schriftenverzeichnis</u>	93

A. Einleitung und Fragestellung

Fast alle Erreger von Pflanzenkrankheiten sind im Verlaufe der Pathogenese gezwungen, in Gewebe einzudringen und sich darin auszubreiten. Wenn auch für das Eindringen in manchen Fällen mechanische Kräfte verantwortlich gemacht werden oder natürliche Öffnungen und Wunden als Eintrittspforten dienen können, so scheinen doch für die Ausbreitung im Gewebe in jedem Falle lytische Faktoren erforderlich zu sein. Durch sie wird dem Erreger nicht nur das Vordringen erleichtert, vielmehr werden durch den Abbau der hochpolymeren Gerüstsubstanzen auch zusätzliche Nährstoffe bereitgestellt. In diesem Zusammenhang wird in den letzten Jahren pektolytischen und cellulolytischen Enzymen eine zunehmende Bedeutung beigemessen (NORKRANS 1963a, BATEMAN und MILLAR 1966). Für diese Zusammenhänge spricht einerseits die Beteiligung der Pektinstoffe und der Cellulose am Aufbau und am Zusammenhalt der pflanzlichen Gewebe, andererseits die Produktion pektolytischer und cellulolytischer Enzyme durch pilzliche und bakterielle Krankheitserreger. Da die hochpolymeren Gerüstsubstanzen unter physiologischen Bedingungen zum Teil unlöslich sind, werden für den Aufschluß dieser Substanzen extrazelluläre Enzyme postuliert. Denkbar wäre auch, daß zellgebundene Enzyme nach Autolyse der Zellen freigesetzt werden. Untersuchungen von LYR (1964) u.a. zeigen jedoch, daß bei Pilzen in der Mehrzahl der Fälle eine aktive Enzyausscheidung vorliegt.

Pektine sind nach HENGLEIN (1958) aus D-Galakturonsäuren aufgebaut, die α -1,4-glykosidisch zu Fadenmolekülen unterschiedlicher Kettenlänge mit kolloidalen Eigenschaften verknüpft sind. Die Carboxylgruppen der Galakturonsäurereste sind bei den eigentlichen Pektinen partiell mit Methanol verestert; Pektine können deshalb als partielle Methylester der Polygalakturonsäure angesprochen werden.

Je höher der Veresterungsgrad ist, umso besser löslich sind die Pektine. Völlig demethoxylierte Pektine werden als Pektinsäuren bezeichnet. Sie sind, ebenso wie ihre Calcium- und Magnesiumsalze - die sogenannten Pektate -

in Wasser und verdünnten Säuren unlöslich.

Als Protopektin bezeichnet man natives, wasserunlösliches Pektin (JOSLYN 1962). Über seinen Aufbau und die chemische Zusammensetzung läßt sich noch nichts Genaues sagen, da es schon durch die üblichen Extraktionsmethoden zerstört wird.

In pflanzlichen Geweben werden pektische Substanzen vorwiegend in der Matrix der Primärwand und der Mittellamelle, welche benachbarte Zellen miteinander verkittet, nachgewiesen. Während in der Mittellamelle Ca- und Mg-Pektate vorherrschen, sind in der primären Zellwand vorwiegend veresterte Pektine enthalten. Des weiteren befindet sich unter der Kutikula eine Pektinschicht (MADER 1958, HEINEN und BRAND 1963, MARTIN und JUNIPER 1970). Weiterhin können die gut wasserlöslichen Methylester der Polygalakturonsäure, gelöst im Zellsaft, häufig in Vakuolen ausgewachsener Zellen gefunden werden (KRAMER 1955, MOHR 1969).

Cellulose ist ein wichtiges Bauelement der höheren Pflanzen. Als Bestandteil der primären und vor allem der sekundären Zellwand bewirkt sie die Struktur und die Festigkeit des Pflanzengewebes (RANBY 1958).

Sie besteht - chemisch gesehen - aus Ketten von β - 1,4-glykosidisch verbundenen Glukoseresten. Es werden durchschnittliche Polymerisationsgrade von 14000 erreicht, was ein Molekulargewicht von $2,3 \times 10^6$ und eine Kettenlänge von 7μ (ungefaltete Kette) bedingt (MARX-FIGINI und SCHULZ 1966). Doch ist es denkbar, daß in vivo noch höhere Werte vorliegen, da die Cellulose durch Isolations- und Reinigungsverfahren mehr oder weniger depolymerisiert wird (NORKRANS 1967). Eine weitere Schwierigkeit bei der exakten Bestimmung des Polymerisationsgrades (PG) der nativen Cellulose ist außerdem die Tatsache, daß die β -glykosidischen Ketten sekundär durch Bindungen anderer Art zu größeren Einheiten verbunden sein können. Durch parallele Anordnung unverzweigter Celluloseketten entstehen sogen. Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von $50 - 100 \text{ \AA}$ (ROELOFSEN 1965). FREY-WYSSLING und MÜHLETHALER (1963) nehmen Elementarfibrillen von $35 \text{ \AA}$ als niedere Bauelemente der Mikrofibrillen an.

Durch gitterartige Anordnungen und Faltungen der Fibrillen entstehen höhere Struktureinheiten (MANLEY 1964, HEYN 1966, MARX-FIGINI und SCHULZ 1966). Von großer Bedeutung für die Eigenschaft der nativen Cellulose scheint das Vorliegen zweier Zustandsformen zu sein. Etwa 70% der Cellulose liegt in kristallisierter Form (Cellulose I) vor (FREY-WYSSLING 1969). Der verbleibende semi- oder parakristalline Anteil ist durch einen weniger stark ausgeprägten Ordnungszustand gekennzeichnet. Die Cellulose ist in eine Kohlenhydrat-Matrix, die aus Hemicellulose und pektischen Substanzen besteht, eingebettet.

Pektische und cellulolytische Enzyme

Die pektolytischen Enzyme lassen sich nach heutigen Kenntnissen (BATEMAN und MILLAR 1966) in drei Gruppen einteilen:

1. Pektinmethylesterase (PME)

Enzyme dieses Typs überführen hochveresterte Pektine durch Spaltung der Esterbindung unter Freisetzung von Methanol in niedrigveresterte und letztlich in Pektinsäure. Die Polygalakturonsäurekette selbst wird nicht gespalten.

2. Polygalakturonasen (PG; Poly- β -1,4-galakturonid-glykanhydrolasen)

Hier eingeordnete Enzyme werden den Hydrolasen zugeordnet, sie katalysieren die Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindungen der Galakturonsäurereste und führen auf diese Weise zu einer fortschreitenden Verkürzung der Molekülketten. Hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheidet man zwischen Polygalakturonasen im engeren Sinne, welche Pektinsäure bevorzugt abbauen, und Polymethylgalakturonasen, die in erster Linie Pektine, die Methylester der Pektinsäure, angreifen.

Der Angriffspunkt der Enzyme am Kettenmolekül führt zu einer weiteren Charakterisierung der Polygalakturonasen. Je nachdem, ob die Enzyme das Substratmolekül an beliebigen Stellen nach dem Zufallsprinzip aufspalten oder nur von den Kettenenden her angreifen, wobei meist Mono- oder Disaccharide abgespalten werden, unterscheidet man

zwischen endo- bzw. exo-Polygalakturonasen. Die Mehrzahl der bisher beschriebenen Enzyme sind endo-Formen.

3. Pektin-Transeliminases (PTE, Poly- α -1,4-D-galakturonid-lyase.

Transeliminases spalten die Glykosidbindungen nicht hydrolytisch, sondern transeliminativ. Sie sind in die Gruppe der Lyasen einzuordnen. Der wesentliche Unterschied dieses Spaltungsmechanismus von der Hydrolyse ist die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten. Auf Grund der Substratspezifität ist nach BATEMAN und MILLAR (1966) auch hier zwischen Pektinsäure spaltenden (Polygalakturonat-Transeliminases) und solchen, die veresterte Pektine bevorzugt abbauen (Pektinmethyl-Transeliminases) zu unterscheiden. Die Einordnung in endo- und exo-Formen orientiert sich nach den für die Polygalakturonasen geltenden Gesichtspunkten.

Wie schon bei den Polygalakturonasen sind auch hier die endo-Enzyme häufiger nachgewiesen worden.

Der Abbau der Cellulose vollzieht sich stufenweise, wobei nach heutiger Auffassung mehrere Komponenten beteiligt sind. REESE et al. (1950) haben gezeigt, daß zahlreiche Mikroorganismen lediglich durch NaOH oder andere Agenzien modifizierte Cellulose angreifen können, während nur wenige Organismen zum Abbau nativer Cellulose, wie etwa Baumwollfasern, befähigt sind. Um diese Unterschiede zu erklären, wurden deshalb mindestens zwei verschiedene Cellulasen postuliert, die als C_1 - und C_x -Enzym bezeichnet werden. Danach soll das C_1 -Enzym die native, mehr oder weniger kristalline Cellulose in kürzere, lineare Anhydroglukoseketten überführen, welche durch die C_x -Cellulase nach Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung zu löslichen, niedermolekularen Produkten, letztlich bis zur Glukose, hydrolysiert werden. Aus dieser Erkenntnis wurde von den Autoren gefolgert, daß "echte Cellulosezer-setzer" mit C_1 - und C_x -Komponenten ausgerüstet sein müssen, während den Organismen, die lediglich modifizierte Cellulose zu hydrolysieren vermögen, die C_1 -Komponente fehlt.

Noch vor einigen Jahren herrschte die Meinung vor, daß zellfreie Enzympräparate nicht oder nur im geringsten Ausmaße

zum Abbau nativer Cellulose befähigt sind (JURÁŠEK et al. 1967).

In der folgenden Zeit gelang es dann jedoch mehrfach, mit zellfreien Kulturfiltraten von Myrothecium verrucaria (HALLIWELL 1962, SELBY et al. 1963), Trichoderma viride (LI et al. 1965, SELBY und MAITLAND 1967a), Trichoderma koningii (HALLIWELL 1965, WOOD 1968) und Fusarium solani (WOOD und PHILLIPS 1969) eine C₁-Wirkung zu erzielen. SELBY und MAITLAND (1967b) war es möglich, die C₁-Komponente aus Kulturfiltraten von T. viride zu isolieren. Dieses C₁-Enzym ist aber alleine nicht dazu befähigt, native Cellulose anzugreifen. Für die C₁-Wirkung ist die Einwirkung beider Komponenten erforderlich. Ähnliche synergistische Wirkungen stellten auch LI et al. (1965) und WOOD (1968) fest.

SELBY und MAITLAND (1967b) charakterisierten die C₁-Komponente von T. viride als ein Glycoprotein, ohne jedoch eindeutige Aussagen über dessen Wirkungsmechanismus machen zu können. Die Bedeutung zellwandzerstörender Enzyme in der Pathogenese ist dort am augenscheinlichsten, wo schon makroskopisch eine Auflösung der befallenen Gewebepartien zu erkennen ist. Dies trifft vor allem für Naß- und Weichfäulen zu.

BROWN (1915) erkannte als erster die Bedeutung, die den pektolytischen Enzymen bei der Entstehung von Weichfäulen pilzlichen und bakteriellen Ursprungs zukommt. In der Folgezeit konnten bei zahlreichen Wirt/Parasit-Kombinationen ähnliche Beziehungen nachgewiesen werden (Zusammenfassungen bei HUSAIN und KELMAN 1959, WOOD 1960, NORKRANS 1963a, BATEMAN und MILLAR 1966 sowie ALBERSHEIM et al. 1969).

Das Krankheitssymptom der Halmbruchkrankheit des Weizens, verursacht durch den Pilz Cercospora herpotrichoides Fron., ist im fortgeschrittenen Stadium durch eine weitgehende Vermorschung des Halmgrundes der befallenen Pflanzen ausgezeichnet. Diese Tatsache läßt vermuten, daß der Erreger zellwandzerstörende Enzyme ausscheidet. Jüngste Ergebnisse von DEFOSSE (1971) scheinen diese Annahme zu bestätigen. Auf Grund histochemischer Untersuchungen befallener Weizen-

und Gerstenpflanzen kommt der Autor zu dem Schluß, daß sowohl Cellulose als auch pektinhaltige Substanzen der Zellwände beim Eindringen des Pilzes enzymatisch angegriffen werden.

Untersuchungen von GARRETT (1963) zeigten, daß Cercosporella herpotrichoides eine geringe cellulolytische Aktivität besitzt und demnach zu solchen Leistungen befähigt zu sein scheint.

Cercosporella herpotrichoides, zu den Fungi imperfecti gehörend, wurde 1912 von FRON erstmals in Frankreich beschrieben. In den folgenden Jahren wurde in einer Vielzahl von Arbeiten der Pilz, seine Biologie und Ökologie, von ihm erzeugte Symptome sowie das charakteristische Bild einer Masseninfektion im Feldbestand beschrieben (Einzelheiten und Literaturübersicht bei LANGE-DE LA CAMP 1966a, SCHULZ 1967, HARTZ 1969).

In neuerer Zeit standen vorwiegend Fragen der Epidemiologie sowie der Bekämpfung im Vordergrund (FUCHS und GROSSMANN 1960, DIERCKS 1963, 1965, 1966, DEBRUCK 1965, LANGE-DE LA CAMP 1966c, SCHULZ 1967, FEHRMANN 1970).

Der Pilz durchwächst in Bodennähe die Blattscheiden befallener Pflanzen und dringt schließlich in den Halm ein. Die befallenen Partien nekrotisieren unter Ausbildung typischer Augen- oder Medsillonflecke.

Die Halmbruchkrankheit tritt verstärkt auf, wenn anfällige Arten innerhalb der Fruchtfolge bevorzugt angebaut werden. Dabei ist der Weizen die am empfindlichsten reagierende Halmfrucht, jedoch werden auch Gerste, Hafer und Roggen sowie zahlreiche Gräser befallen (HARTZ 1969).

Anzeichen für das Auftreten physiologischer Rassen hat LANGE-DE LA CAMP (1966b) gefunden. Mit gewissen Einschränkungen war es möglich, Isolierungen von verschiedenen Wirtspflanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Wuchstypen in vitro zu ordnen. Hinsichtlich der Aggressivität der einzelnen Erregerstämme unterscheidet die Autorin zwischen zwei Aggressivitätstypen, von denen der eine (W-Typ) Weizen und Gerste stark, Roggen schwach, der andere (R-Typ) dagegen Roggen stark, Weizen und Gerste aber weniger stark befällt. Innerhalb der beiden Typen treten stark und schwach aggres-

sive Isolate auf. Die Vertreter dieser beiden Typen unterscheiden sich ferner darin, daß die Infektiosität der R-Typen in der Mehrzahl der untersuchten Fälle bei niederen Temperaturen am größten ist, während die W-Typen höhere Temperaturen zur Erzielung eines maximalen Befalls benötigen (LANGE-DE LA CAMP 1967).

Über die Pathogenese der Halmbruchkrankheit gibt es, abgesehen von den erwähnten Arbeiten von DEFOSSE und GARRETT sowie einigen histologischen Befunden, keine weiteren Hinweise. Da die Mitwirkung pektolytischer und cellulolytischer Enzyme bei der Genese vieler Pflanzenkrankheiten erwiesen ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Cercospora herpotrichoides Fr. zur Bildung dieser Enzyme in vitro befähigt ist.

Dazu wurde das Wachstum und die Enzymsynthese des Pilzes in einem flüssigen Nährmedium in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen und vom Kulturalter erfaßt. Auf Grund des Wirkungsmechanismus und der Substratspezifität der ausgeschiedenen pektolytischen Enzyme wurde versucht, diese näher zu charakterisieren. Einige wichtige Eigenschaften der einzelnen Enzyme wurden ermittelt.

Die Untersuchungen schlossen ferner cellulolytische Enzyme ein, wobei neben der C_x -Cellulase auch die C_1 -Komponente erfaßt wurde.

B. Material und Methoden

1. Herkunft der Pilzkulturen

Insgesamt 20 verschiedene Herkünfte von Cercospora herpotrichoides Fron wurden auf ihre Fähigkeit, pektolytische und cellulolytische Enzyme zu bilden, untersucht.¹⁾

Isolierung Nr.	Isolierungs- ORT	Isolierungs- JAHR	
137	Halsdorf	1958	Getreidestoppel
147	Affoldern	1960	Weizen
148	"	1960	"
149	"	1960	"
150	"	1960	"
151	"	1960	"
153	"	1960	"
193	ohne nähere Angabe		
194	Grone	-	Wi-Gerste
196	Roßdorf-Grone	-	"
21e	Brackel/Höxter	1965	Weizen
7/1	Vinstedt/Ülzen	1965	"
42/4	Scharfoldendorf/Gött.	1966	So-"
46/7	Gammelmark (Dänemark)	1967	So-"
12/7	Kitzeberg	1965	W- "
65/7	Christiansthal/ Holst.	1966	W- "
14/2	ohne nähere Angabe		
6/1	Meisdorf /Harz		W- "
43/1	Tanne/Harz	-	Roggen
98/2	-	-	Weizen

¹⁾ Für die Überlassung der Kulturen sei den Herren Prof.Dr. Dr.h.c. W.H. Fuchs, Institut für Pflanzenpathologie der Universität Göttingen, und Dr. H.Bockmann, Kiel-Kitzeberg, sowie Frau Dr. Dr.M. Lange-de la Camp, Institut für Phytopathologie Aschersleben, bestens gedankt.

2. Anzuchtmethoden

2.1. Gewinnung von Impfmateriäl

Die Pilzkulturen wurden zur Erhaltung und Vermehrung auf Czapek-Dox-Agar (MÜLLER und MELCHINGER 1964) kultiviert, wobei jedoch Glukose durch den gleichen Anteil Maltzin - einem Malzextrakt (Dismalt AG, München 13) - ersetzt war. Für spezielle Untersuchungen wurden als weitere C-Quellen ein hochgereinigtes Apfelpektin der Firma Schuchardt, München, und Carboxymethylcellulose (Tylose 600) der Firma Serva, Heidelberg, verwendet. Als weitere Komponente enthielt der Agar 0,1% Hefeextrakt (Difco).

Jede Petrischale erhielt 20 ml Nährboden. Eine Überimpfung der Kulturen erfolgte jeweils nach 3-4 Wochen, wobei bewachsene Agarscheiben ($\varnothing$ 9 mm) aus der Randzone der Pilzkulturen benutzt wurden. Die beimpften Petrischalen standen bei 19-22°C im Dunkeln. Um mikrobielle Verunreinigungen auszuschließen, wurden die Kulturen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch überprüft und außerdem Proben davon auf Fleischextrakt-Pepton-Agar ausgestrichen.

2.2. Gewinnung der Enzyme

Die Kultivierung der Pilze auf Nährlösung erfolgte in der Regel in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nährsubstrat. Nur zur Gewinnung einer größeren Menge einheitlichen Enzymmaterials wurden Penicillinkolben mit 900 ml Nährlösung benutzt. Als Grundnährlösung diente folgendes Medium:

0,3 % NaNO_3	}	gelöst in 0,2 M Phosphatpuffer pH 5,4
0,05 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		
0,05 % KCl		
0,001 % $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$		
0,1 % Hefeextrakt		

Als C-Quellen wurden Citruspektin (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) und Maltzin (Dismalt AG, München 13) jeweils zu 0,5 % verwendet. Glukose, Carboxymethylcellulose (Tylose 600) und Linterspulver (Schleicher und Schüll) wurden ebenfalls auf ihre Verwertbarkeit hin untersucht. Die bei 120°C autoklavierten Nährsubstrate wurden mit 3 Wochen altem Myzel beimpft, wobei die Erlenmeyerkolben ein und die Penicillinflaschen 10 Agarscheibchen ($\varnothing$ 9 mm) er-

hielten. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Impfscheibchen auf der Flüssigkeit schwammen und nicht untergingen. Die Inkubationszeit betrug für zeitunabhängige Versuche 4-5 Wochen bei 19-22°C in Dunkelheit. Danach wurden die Myzeldecken abfiltriert. Fielen größere Mengen von Kulturfiltrat an, so wurden sie bis zu ihrer weiteren Verarbeitung eingefroren.

Als Enzymquellen dienten die Kulturfiltrate, die, je nach den Erfordernissen, unverändert, dialysiert (8 Std. gegen fließendes Wasser und 12 Std. gegen aqua dest.) oder eingengt (im BÜCHI-Rotationsverdampfer bei 30°C) verwendet wurden. Hitzeinaktivierte Filtrate wurden, wenn nicht anders angegeben, bei den Enzymbestimmungen als Kontrollen herangezogen.

3. Bestimmung des Pilzwachstums

3.1. Wachstum auf festem Nährsubstrat (Koloniedurchmesser)
Die täglichen Zuwachsraten sowie die Koloniedurchmesser wurden entlang von vier markierten, im Winkel von 90° aufeinanderstehenden Linien bestimmt.

3.2. Wachstum in Nährlösungen (Myzeltrockengewicht)
Zur Bestimmung des Myzeltrockengewichts wurden die Kulturen über zuvor getrocknetes und gewogenes Filterpapier (Schleicher und Schüll Nr. 595a) abfiltriert. Nachdem etwaige Nährlösungsreste mit Wasser vom Filter ausgewaschen waren, wurden die Myzelien 4 Stunden bei 105°C getrocknet und gewogen. Die Gewichts Differenz zwischen beiden Wägungen ergab das Myzeltrockengewicht.

4. Anzüchtmethoden unter veränderten Kulturbedingungen

4.1. Vorkultur

Zur Klärung der Frage, ob die Vorkultur des Inokulums auf Pektin oder Cellulose ein späteres Aufschließen dieser Substanzen begünstigt, wurden die Pilze auf Maltzin-Agar, Pektin-Agar und Cellulose-Agar angezogen. Als Grundlage diente wiederum Czapek-Dox-Agar mit einem 1,0%igen Anteil der jeweiligen C-Quelle.

4.2. Schüttelkultur

Schüttelkulturen wurden auf einem Schüttler mit kreisender Bewegung bei einer Frequenz von 100 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

4.3. Lichteinfluß

Zur Prüfung des Lichteinflusses auf Myzel- und Enzymproduktion wurden beimpfte Kolben bei 20 (± 1) °C aufgestellt und ständiger Belichtung ausgesetzt. Die Kontrollen waren zur Abhaltung des Lichtes mit Aluminiumfolie umwickelt. Als Lichtquelle diente eine Neonröhre "Osram" 65 W, 31/R. Die Lichtmessung erfolgte mittels Luxmeter (Firma Grossen, Typ Candela) und ergab in Höhe des Flüssigkeitsspiegels eine Lichtintensität von 1000 Lux.

4.4. Temperatureinfluß

Hierzu wurden beimpfte Petrischalen bzw. beimpfte Kolben bei Temperaturen von 5-25°C mit Abstufungen um jeweils 5°C (± 1 °C) im Reihenthermostaten (Rubarth und Co., Hannover) aufgestellt.

5. Bestimmung der pektolytischen Aktivität

5.1. Cup-plate-Methode

Erste Anhaltspunkte für die Gegenwart pektolytischer Enzyme wurden mit dem Plattentest (DINGLE et al. 1953) gewonnen. Eine 2%ige Agarlösung mit 1 % Natriumpektat (Produkt Nr. 6024, Sunkist Growers, Inc. Ontario, Calif.) und 0,01 % Salicylanilid, gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,0 (nach SÖRENSEN), wurde zu 20 ml in Petrischalen ausgegossen. In ausgestanzte Löcher ($\varnothing$ 8 mm) wurden 0,2 ml Kulturfiltrat (pH 5,0) eingefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 30°C wurde die Agarschicht mit 5 ml 5 N HCl überschichtet. Der Durchmesser der sich bildenden Aufhellungszone galt als Maßstab für die pektolytische Aktivität.

5.2. Viskosimetrische Verfahren

Hierfür wurde ein Brookfield-Rotationsviskosimeter, Typ LVF, mit U.L.-Adapter benutzt, das für Untersuchungen dieser Art nach den Feststellungen von SHERWOOD und KELMAN (1964) sowie DURBIN und HUPPLER (1965) geeignet ist. Für die Messungen wurde eine Geschwindigkeit von 60 Umdr./Min. gewählt.

Als Substrat diente das schon erwähnte Apfelpektin- bzw. Natriumpektat in einer 1,6%igen Konzentration. Ammoniumoxalat (0,8%) wurde beigelegt, um die Bildung unlöslicher Ca-Pektate zu verhindern. Substrat und Enzymlösung wurden unmittelbar vor der Messung auf 30°C vorgewärmt und zu je 12,5 ml in die Adapterhülse einpipettiert. Die Temperatur während des Meßvorganges betrug $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Nach 1 Min. Reaktionszeit erfolgte die erste Ablesung, weitere Ablesungen, je nach Aktivität des verwendeten Kulturfiltrates, in ein- oder dreiminütigem Abstand.

Die Messung wurde in der Regel dann beendet, wenn ein 50%iger Viskositätsverlust erreicht war. Als Bezugsgröße galt hierfür die Viskosität eines Reaktionsgemisches mit hitzeinaktivierter Enzymlösung, während als theoretischer Endwert die Viskosität einer vollständig zu Galakturonsäure abgebauten Pektinlösung zugrundegelegt wurde. Der 50%ige Viskositätsverlust errechnet sich somit nach der Formel $\frac{V_A - 0,96}{2}$, wobei V_A die Ausgangsviskosität des Reaktionsgemisches (in cP) darstellt.

Nach BATEMAN (1963) wird die Enzymaktivität in RA-Einheiten (RA = Relative Aktivität) pro ml oder g Enzym ausgedrückt und nach der Formel $RA = \frac{1}{t} \times 1000$ errechnet, wobei t die Zeit in Minuten bedeutet, die für einen 50%igen Verlust der Ausgangsviskosität erforderlich ist.

Da sich in unseren Versuchen keine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Viskositätsverlust ergab, nahmen wir keine Umrechnung auf 1 ml Enzymlösung vor.

Lagen innerhalb einer Versuchsreihe Kulturfiltrate vor, die eine 50%ige Viskositätsminderung nicht oder nur nach sehr langen Inkubationszeiten herbeiführten, wurden die Reaktionsgemische in einem Thermostaten bei 30°C inkubiert und der Viskositätsverlust nach Ablauf der Inkubation bestimmt. (Hinweise über die gewählten Reaktionszeiten werden bei den entsprechenden Versuchen gegeben).

5.3. Erfassung reduzierender Gruppen

Methode nach NELSON (1944)

Als Substrate dienten 0,25%ige Pektat- bzw. Pektinlösungen mit dem gleichen Anteil an Ammoniumoxalat. Aus dem Reaktionsgemisch, das aus 2 ml Substrat und 2 ml dialysiertem

Kulturfiltrat bestand und das für 4 Std. bei 30°C inkubiert war, wurde eine Probe von 1 ml entnommen. Dazu kam 1 ml des nach NELSON hergestellten Reagenzgemisches. Die Proben wurden 20 Min. im Wasserbad gekocht, danach abgekühlt, sodann mit 1 ml NELSON-Färbereagenz versetzt, mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt und anschließend im Beckman DB Spektralphotometer zur Absorptionsmessung bei 500 und 520 nm verwandt. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen Substrat und Kulturfiltrat unmittelbar vor dem Erhitzen zusammengegeben wurden.

Methode nach KERTESZ (1955)

5 ml Substratlösung (1%) wurden mit 5 ml dialysiertem Kulturfiltrat 4 Std. lang bei 30°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch 1,8 ml einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung und Zusatz von 5 ml einer 0,1 N Jodlösung wurden die Proben für 20 Min. im Dunkeln aufgestellt. Nachdem 4 ml einer 2 M Schwefelsäure sowie 2 ml 0,5%iger Stärke hinzugefügt waren, wurde der Jodüberschuß mit einer 0,05 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert. In den Kontrollen war durch Zugabe von Na_2CO_3 -Lösung die Enzymreaktion von vornherein unterbunden.

5.4. Nachweis von Transeliminassen

Zwei Verfahren wurden auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht.

Nach AYERS et al. (1966) enthielten die Ansätze:

- 4 ml dialysiertes Filtrat
- 1 ml 0,2 M Puffer
- 1 ml 0,01 M CaCl_2
- 4 ml 1% Pektin- bzw. Pektatlösung

Im pH-Bereich von 3,5-7,0 wurde Citrat/Phosphat-Puffer und für höhere pH-Werte Tris/HCl-Puffer verwandt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 30°C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 0,6 ml 9% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 0,6 ml 0,5 N NaOH abgestoppt. Als Bezugsbasis dienten Ansätze, in denen die Enzymreaktion durch die beiden erwähnten Reagenzien unmittelbar nach Versuchsbeginn abgestoppt wurde. Der nach kräftigem Schütteln entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (20 Min./6000 g) und verworfen, während im Überstand mit dem Beckman DB Spektralphotometer die Absorption bei 230 nm bestimmt wurde. Anschließend wurden 5 ml

des Zentrifugats mit 3 ml 0,04 M Thiobarbitursäure, 1,5 ml N HCl und 0,5 ml dest. Wasser versetzt, 30 Min. im Wasserbad erhitzt und danach abgekühlt. Die entstehende rote Färbung kennzeichnet Abbauprodukte der Transeliminase und hat bei 550 nm ein Absorptionsmaximum.

Die von SHERWOOD (1966) beschriebene Methode wurde in abgewandelter Form zum Nachweis der Lyasen herangezogen.

Zu 2 ml dialysiertem Kulturfiltrat kamen 2 ml 0,2 M gepufferte 0,25%ige Substratlösung (Citrat/Phosphat-bzw. Tris/HCl-Puffer). Die Reaktion wurde in den Kontrollen sofort nach dem Zusammengeben der beiden Komponenten und bei den aktiven Proben zum Ende der Reaktionszeit mit 3 ml 0,1 N HCl abgestoppt. Für die Messung bei 230 nm wurde 1 ml des Reaktionsgemisches abpipettiert und mit 5 ml H₂O vermischt. Bei sehr aktiven Kulturfiltraten mußte, um in einen günstigen Meßbereich zu gelangen, die Wasserzugabe auf 10 ml erhöht werden. Zum Rest des Reaktionsgemisches wurden lediglich 3 ml 0,04 M Thiobarbitursäure zugefügt, das dann, wie schon früher beschrieben, weiter behandelt wurde. Für die Absorptionsmessung bei 550 nm war in einigen Fällen eine Verdünnung der Meßproben erforderlich.

5.5. Nachweis der Pektinmethylesterase

Die PME-Aktivität wurde in Anlehnung an ein Verfahren von KERTESZ (1955) bestimmt. Als Substrat diente hierzu eine in 0,167 N NaCl gelöste, ungepufferte 1,67%ige Pektinlösung. 50 ml dieser Lösung wurden mit 50 ml dialysierten Filtrat 30 Min. bei 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) gehalten. Die während dieses Zeitraumes infolge der Demethoxylierung des Pektins eintretende Säurebildung wurde durch fortlaufende Titration mit 0,02 N NaOH ausgeglichen. Der pH-Wert wurde auf diese Weise ständig auf dem gewünschten Wert gehalten. Die pH-Messung erfolgte mit einer Glaselektrode. Aus dem Laugenverbrauch ließen sich, nach Abzug der in dem Substratgemisch mit hitzeinaktiviertem Enzym verbrauchten Lauge, die hydrolysierten Ester in μ -Äquivalenten errechnen.

5.6. Chromatographischer Nachweis von Pektin- bzw. Pektat-Abbauprodukten

Unter sterilen Bedingungen wurden Pektin- oder Pektatlösungen (je 0,5%) bis zu 48 Stunden bei 30°C bei pH 4,5-5,0 bzw.

8,0 mit undialysierten oder dialysierten Kulturfiltraten inkubiert. Teile des Reaktionsgemisches wurden auf Papier (2043b Mg1. Schleicher & Schüll) oder auf mit Kieselgel G beschichtete Platten aufgetragen. Die papierchromatographische Trennung erfolgte nach dem von PAGE (1961) beschriebenen Verfahren.

Lösungsmittel: 50 mg Bromphenolblau + 60 mg Natriumformiat,
gelöst in 85 ml 77 %igem Äthanol + 15 ml
88 %iger Ameisensäure

Monogalakturonsäure erscheint als gelber Flecken auf dem getrockneten Papier.

Als Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie diente n-Butanol-Ameisensäure-Wasser (2:3:1). Die Platten wurden getrocknet, mit Vanillin (0,5%)-Schwefelsäure besprüht und anschließend im Trockenschrank auf 120°C erhitzt (KOLLER und NEUKOM 1964).

6. Bestimmung der cellulolytischen Aktivität

6.1. Bestimmung der C_x -Aktivität

6.1.1. Cup-plate-Methode

Hier wurde in ähnlicher Weise, wie schon bei der Bestimmung der pektolytischen Aktivität beschrieben, verfahren. Eine heiße 2%ige Agarlösung mit 1% Carboxymethylcellulose (CMC) als Substrat und 0,01% Salicylanilid, gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 6,0, wurde zu je 20 ml in Petrischalen gegossen. Die Schalen wurden, nachdem die aus dem Gel ausgestanzten Löcher ($\varnothing$ 8 mm) mit 0,2 ml Probelösung gefüllt waren, für 30 Stunden bei 30°C aufgestellt. Die kreisförmige Abbauzone wurde mit 10 %igem Kupferazetat sichtbar gemacht.

6.1.2. Viskosimetrische Verfahren

Hier gilt, was schon bei der viskosimetrischen Bestimmung der pektolytischen Aktivität gesagt wurde. Als Substrat diente jedoch 0,8 %ige CMC (Tylose 600)-Lösung in 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0. Lediglich bei Untersuchungen über einen weiteren pH-Bereich wurde McILVAINE-Puffer der gleichen Konzentration gewählt. Zur Messung kamen Proben, die zu je 12,5 ml aus Substrat und Filtrat bestanden.

6.1.3. Erfassung reduzierender Gruppen

Die C_x -Aktivität wurde auch durch die Erfassung reduzierender Endgruppen bestimmt. Die Versuchsdurchführung glich den bei den pektolytischen Enzymen beschriebenen Verfahren. Als Substrat wurde jedoch eine 0,1 M (Phosphatpuffer nach SÖRENSEN) gepufferte 0,25 %ige Carboxymethylcelluloselösung (Tylose 600) verwandt. Die Inkubationszeit betrug 10 Std. bei 30°C.

6.2. Bestimmung der C_1 -Aktivität

6.2.1. C_1 -Aktivität in Gegenwart des Pilzes

6.2.1.1. Gewichtsverlust von Filtrierpapier

Ein Hinweis für die C_1 -Aktivität war der Gewichtsverlust von mit dem Pilz in Nährlösung inkubierten Filtrierpapierstreifen (Schleicher & Schüll 595a).

6.2.1.2. Verlust der Reißfestigkeit von Baumwollfäden

Ein zweiter Nachweis gründete sich auf den Verlust an Reißfestigkeit von Baumwollfäden. Dafür wurden 55 cm lange Fadenstücke in Erlenmeyerkolben mit der üblichen Nährlösung eingehängt bzw. auf den Kolbengrund gelegt (siehe Abb. 39) und nach dem Sterilisieren beimpft. Durch diese Versuchsanstellung wurde erreicht, daß im ersten Fall die Fäden durch die sich entwickelnde Myzeldecke mit der Masse des Pilzes Kontakt hatten, während sie im zweiten Fall nur von seinen Stoffwechselprodukten beeinflusst wurden.

Um einen noch innigeren Kontakt zwischen Pilz und Substrat herzustellen, wurde bei einer weiteren Versuchsanstellung in einer Petrischale ein Myzelstück direkt auf einen Baumwollfaden geimpft. Jede Petrischale enthielt 12,5 ml Standardlösung. In zwei weiteren Versuchen wurde die Nährlösung dahingehend abgewandelt, daß Glukose (1 %) bzw. Linterspulver (1 %) als alleinige C-Quelle dienten. Zwei unterschiedlich starke Baumwollfäden (100 % Baumwolle), ein Garn mit der metrischen Nummer 34/1¹⁾ (Vogtländische Baumwollspinnerei Hof/Saale) und ein Zwirn der Karstadt AG (Nm 116/2) wurden für diese Bestimmungen verwendet. Zur Ermittlung der Reißfestigkeit diente ein Garnfestig-

1) siehe S. 17

keitsprüfer²⁾ (Zweigle KG, Reutlingen, Type 37/1, 1966) (Abb. 1). Die Reißfestigkeitsverluste galten als Maß für die C_1 -Aktivität.

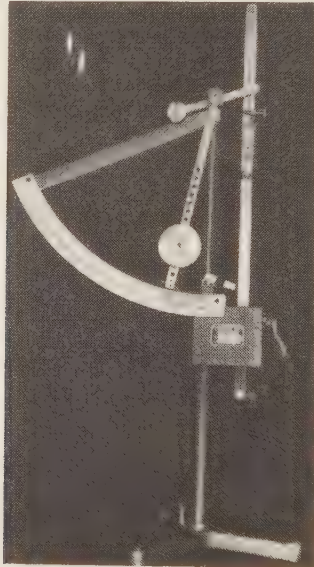


Abb. 1: Garnfestigkeitsprüfer

6.2.2 C_1 -Aktivität in zellfreien Kulturfiltraten

Zellfreie Kulturfiltrate (pH 6,0), durch Filtration über ein Bakterienfilter (Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,1 μ) gewonnen, wurden zu je 5 ml in Reagenzgläsern mit sterilen Baumwollfäden bei Zimmertemperatur bis zu 8 Wochen inkubiert. Vor der Auswertung wurde durch mikroskopische Untersuchungen und durch Ausstreichen auf Fleischextrakt-Pepton-Agar sichergestellt, daß die Proben keimfrei waren. Die C_1 -Wirkung wurde auch hier durch den Reißfestigkeitsverlust der Baumwollfäden erfaßt.

1)2) Für die Überlassung des Materials und des Garnfestigkeitsprüfers sei Herrn Direktor Stübiger und Herrn Textilingenieur Meister von der London Knitwear GmbH. & Co., Gießen, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

7. Bestimmung der mazerierenden Fähigkeit der Kulturfiltrate

Nach einer Methode von GROSSMANN (1962) wurden Kulturfiltrate zu je 5 ml in kleine Glasröhrchen einpipettiert, wobei zugefügtes Toluol mikrobielle Verunreinigungen unterdrücken sollte. Jedes Glasröhrchen erhielt vier Scheibchen (9 mm Ø, 0,5 mm dick) aus dem Fruchtfleisch von Gurken. Die Gläschen wurden bei 30°C aufgestellt. Nach verschiedenen Zeitabständen wurde das Ausmaß der Mazeration im Anschluß an 10-maliges kräftiges Schütteln durch Druck mit dem Fingernagel beurteilt.

Dabei wurden folgende Stufen unterschieden:

- 0 = keine Mazeration: Bei Druck mit dem Fingernagel deutliches Knirschen des Gewebes
- + = leichte Mazeration: kein deutliches Knirschen mehr; beim Schütteln noch kein Zerfall der Scheibchen (evtl. Randbeschädigungen), doch lassen sich diese durch Druck mit der Fingerkuppe leicht zerquetschen.
- ++ = starke Mazeration: Scheibchen zerfallen beim Schütteln in einige größere Bruchstücke.
- +++ = völlige Mazeration: Scheibchen zerfallen beim Schütteln in zahlreiche, sehr kleine Teilchen.

Zwischenstufen werden durch ein eingeklammertes Kreuz gekennzeichnet.

8. Ermittlung der Temperatur- und pH-Stabilität der Enzyme

8.1. Temperaturstabilität

Hierzu wurden die Kulturfiltrate zunächst auf pH 7,0 eingestellt, zu 10 ml in dünnwandige Reagenzgläser gegeben und danach für 30 Minuten bei den gewünschten Temperaturen im Wasserbad gehalten. Im Anschluß daran wurden sie in Eiswasser rasch abgekühlt und anschließend zur Aktivitätsbestimmung verwendet.

8.2. pH-Stabilität

Kulturfiltrate wurden auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und nach dem Zusatz von einigen Tropfen Toluol für 14 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Nachdem die Proben auf den für die einzelnen Enzymkomponenten optimalen pH-Wert gebracht waren, wurden sie auf gleiche Volumina aufgefüllt

und auf ihre Aktivität geprüft.

9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Benutzung des "Diehl Combitron S".

Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die Varianzanalyse sowie der t-Test (nach STUDENT) wurden nach CAVALLI-SFORZA (1969) durchgeführt.

C. Ergebnisse

1. Vergleichende Prüfung verschiedener Pilzherkünfte

Zunächst sollte für die geplante nähere Untersuchung der Enzyme von den 20 vorhandenen Stämmen einer ausgewählt werden, der zu starker Enzymproduktion und - zwecks Gewinnung von Impfmateriel - zu schnellem Wachstum in vitro befähigt ist.

1.1. Myzelwachstum in vitro

In Tab. 1 sind die durchschnittlichen täglichen Zuwachsraten der 20 Stämme sowie die Koloniedurchmesser nach 15 Tagen angegeben.

Die Neigung zu flächenhaftem Ausbreiten war bei allen Isolaten gering. Erst am zweiten Tag war ein radiäres Wachstum der einzelnen Stämme festzustellen. Wesentliche Unterschiede in der Wachstumsleistung der 19 Weizen- und Gerstenherkünfte traten nicht auf. Abgesehen von Isolat 196 wiesen sie nach 15 Tagen Koloniedurchmesser von 45 bis 51 mm auf, bei Zuwachsraten von 3,0 bis 3,4 mm täglich. Alle 19 Isolate besaßen glatten Kolonienrand und wiesen eine pelzige, vorwiegend mousgrau gefärbte Oberfläche auf.

Als einziges Roggenisolat wurde Stamm 43/1 getestet. Er unterschied sich von den geprüften Isolierungen anderer Herkunft durch seine geringe Wuchsleistung von 32 mm in 15 Tagen sowie durch sein Wuchsbild. Der Kolonienrand war nicht glatt ausgebildet, sondern fiedrig ausgefranst. Das nur in geringem Maß gebildete Luftmyzel hatte auf dem verwendeten Nährboden eine gelbliche Tönung.

Tab. 1: Durchschnittliche tägliche Zuwachsraten und Koloniendurchmesser verschiedener Stämme von C. herpeticoides auf abgewandeltem Czapek-Dox-Agar in mm.

Isolat	137	147	148	149	150	151	153	193	194	196	6/1	7/1	43/1	14/2	98/2	42/4	12/7	46/7	65/7	21e
Tägl. Zuwachs- rate	3,1	3,3	3,3	3,4	3,1	3,3	3,4	2,9	3,4	2,5	3,4	3,4	2,1	3,1	3,4	3,3	3,3	3,4	3,1	3,0
Kolonien- durch- messer nach 15 Tg.	46	49	48	51	47	49	51	44	50	38	50	50	32	47	50	49	48	51	46	45

Tab. 2: Pektolytische und cellulolytische Aktivität verschiedener Isolate von C. herpeticoides (nach DINGLE et al. 1953)

Isolat	137	147	148	149	150	151	153	193	194	196	6/1	7/1	43/1	14/2	98/2	42/4	12/7	46/7	65/7	21e
Aufhel- lungs- zone (Ø in cm)	2,5	2,2	2,4	2,4	2,4	2,1	2,1	2,0	2,9	2,7	2,5	2,2	1,2	2,2	2,8	2,4	2,1	2,0	1,9	2,0
	1,6	1,5	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	2,1	1,8	1,7	1,3	1,1	1,5	2,0	1,6	1,4	1,3	1,2	1,2

*) = pektolytische Aktivität

**) = cellulolytische Aktivität

Einige, von SCHULZ schon 1967 verwendete Pilzstämme wurden auf dem von ihm verwendeten Agarmedium (Biomalz-Pepton-Agar) kultiviert und ihre Zuwachsraten ermittelt. Es zeigte sich, daß in dem verstrichenen Zeitraum von 3 Jahren die Pilze nichts von ihrer Wachstumsaktivität eingebüßt hatten.

1.2. Enzymatische Aktivität

1.2.1. Cup-plate-Methode

Erste Anhaltspunkte für die pektolytische und cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate der einzelnen Isolate wurden mit der Cup-plate-Methode gewonnen. Die Standardnährlösung enthielt zu diesem Zeitpunkt lediglich Pektin als C-Quelle und keinen Hefeextrakt, da erst in späteren Versuchen eine möglichst optimale Zusammensetzung der Nährlösung ermittelt werden sollte. Für diesen Test wurden 4 Wochen alte, nicht weiter vorbehandelte Kulturfiltrate verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden für den Nachweis der pektolytischen und von 30 Stunden für den der cellulolytischen Enzyme zeigte sich folgendes Ergebnis (siehe Tab. 2). Die Kulturfiltrate aller 20 Isolate wiesen sowohl eine pektolytische als auch eine cellulolytische Aktivität auf. Dabei waren starke Pektinasebildner in der Regel auch gute Cellulaseproduzenten. Stamm 194 wurde auf Grund seiner hohen enzymatischen Aktivität für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

1.2.2. Viskosimetrische Methode

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde mit Hilfe einer Nährlösung, die eine gute Enzymsubstrate gewährleistete, die pektolytische und cellulolytische Aktivität in den Kulturfiltraten der einzelnen Isolierungen viskosimetrisch bestimmt. Bei der viskosimetrischen Bestimmung der pektolytischen Aktivität wird der Pektinabbau summarisch erfaßt, da das als Substrat verwendete Pektin sowohl von den Polymethylgalakturonasen als auch von den eigentlichen Polygalakturonasen unter Mitwirkung der Pektinmethylesterasen angegriffen wird. Diese Methode gibt auch keinen Aufschluß über den Spaltungsmechanismus.

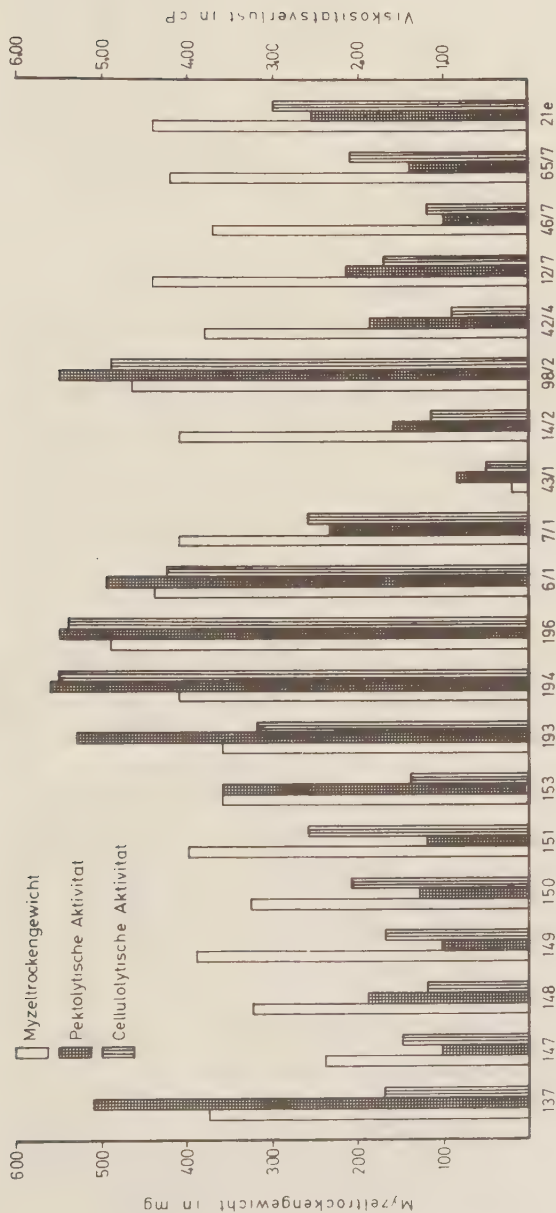


Abb. 2: Myzelrockengewichte, pektolytische und cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate 4 Wochen alter Kulturen 20 verschiedener Stämme von C. herpotrichoides

Da als erstes zu klären war, ob C.herpotrichoides überhaupt pektolytische Enzyme produziert, bot sich die viskosimetrische Bestimmung als geeignete Methode an, da sie die verschiedenen Komponenten gleichzeitig erfaßt. Sie wurde daher in den folgenden Versuchsanstellungen, die lediglich zur Ermittlung günstiger Bedingungen für eine hohe Enzymproduktion dienten, angewandt. Erst später folgte eine spezielle Analyse der einzelnen Komponenten mittels spezifischerer Verfahren.

In Abb. 2 sind die Werte für die Viskositätsverluste, die sich bei der Verwendung 4 Wochen alter Kulturfiltrate ermitteln ließen, sowie die Myzeltrockengewichte der einzelnen Stämme aufgezeigt. Bei der Beurteilung der Abbauwerte ist jedoch zu berücksichtigen, daß für den Pektinase- und Cellulasenachweis unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit dem jeweiligen Substrat (Pektin bzw. CMC) gewählt werden mußten, damit auch die C_x -Aktivität schwach aktiver Stämme erfaßt werden konnte. Die Zeit für den Pektinabbau betrug 45 Minuten, für den Celluloseabbau 90 Minuten. Nach einer 2-wöchigen Bebrütung war die Aktivität zwar noch recht gering, aber die Unterschiede zwischen den einzelnen Isolierungen waren stärker ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse könnte u.a. in einer unterschiedlich langen Anlaufphase der einzelnen Stämme zu suchen sein.

In Übereinstimmung mit den Resultaten des Plattentestes zeichnete sich auch hier Stamm 194 durch hohe Enzymaktivitäten aus. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Untersuchungen mit Stamm 194 durchgeführt. Lediglich bei einigen Versuchen wurden andere Stämme zum Vergleich herangezogen.

2. Auffinden einer optimalen Nährlösung

2.1. Prüfung verschiedener C-Quellen

Um eine hohe enzymatische Aktivität der Kulturfiltrate zu erzielen, wurden verschiedene C-Quellen auf ihre Brauchbarkeit untersucht und der Grundnährlösung sowohl einzeln als auch miteinander kombiniert zugefügt. Es ergaben sich somit folgende Varianten:

1. 1,0 % Citruspektin (P)
2. 1,0 % Glukose (G)
3. 1,0 % Carboxymethylcellulose (C)
4. 1,0 % Maltzin (M)
5. 0,5 % Citruspektin + 0,5 % Glukose (P+G)
6. 0,5 % Citruspektin + 0,5 % Carboxymethylcellulose (P+C)
7. 0,5 % Citruspektin + 0,5 % Maltzin (P+M)
8. 0,5 % Glukose + 0,5 % Carboxymethylcellulose (G+C)
9. 0,5 % Glukose + 0,5 % Maltzin (G+M)
10. 0,5 % Carboxymethylcellulose + 0,5 % Maltzin (C+M)

In zwei weiteren Versuchsgliedern wurde die Glukosekonzentration auf 2 und 3 % erhöht. Von besonderem Interesse war in diesem Falle die Auswirkung auf die Cellulase-Produktion. Um den Einfluß des Hefeextraktes zu verdeutlichen, wurde jede Variante, abweichend von der Grundnährlösung, auch ohne Hefezusatz angesetzt.

Die Inkubationszeit betrug in diesen Versuchen 4 Wochen. Aus Abb. 3 ist zu ersehen, welches Myzeltrockengewicht und welche PG- und C_x -Aktivität beim Angebot der jeweiligen Nährstoffe vom Pilz gebildet wurden. Zwischen Enzymaktivität und Myzelgewicht bestand keine direkte Abhängigkeit. Für das Wachstum schienen die mit dem Hefeextrakt zugeführten B-Vitamine entscheidend zu sein (Vergl. DEFAGO 1941). Maltzin wirkte wahrscheinlich auf Grund seines Gehaltes an B-Vitaminen ebenso günstig. Diese Aussage läßt sich jedoch nur mit Vorbehalten machen, da mit dem Malzextrakt dem Pilz noch weitere Substanzen zur Verfügung gestellt wurden. Wurde die Hälfte des Maltzins durch die entsprechende Menge Glukose oder Cellulose ersetzt, so zeigte sich, daß die Myzelmenge nahezu auf die Hälfte sank. Wurde der Vitaminbedarf durch Hefeextrakt gedeckt, dann war auch mit erhöhter Glukosegabe noch eine weitere Steigerung zu erzielen, und 3% Glukose brachte den höchsten Myzelertrag.

Die Zugabe von Pektin zur Nährlösung war wesentlich für die Pektinasebildung. Die Enzymaktivität sank ab, wenn der Pektinanteil verringert wurde. Glukose, Cellulose und Maltzin bedingten nur eine geringe pektolytische Aktivität der Kulturfiltrate. Die Kombination gewichtsmäßig gleich hoher Anteile zweier C-Quellen (ohne Hefezusatz) führte nur bei

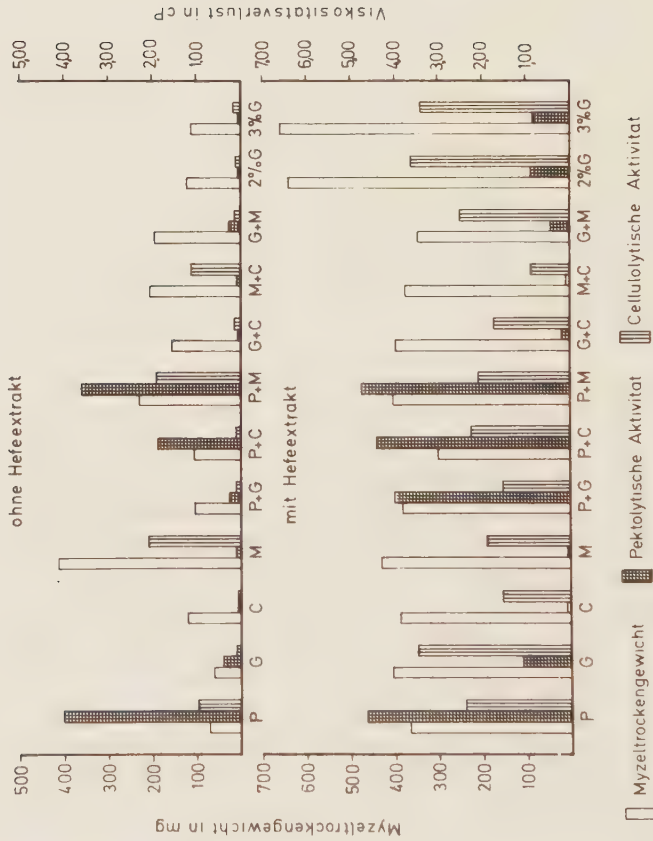


Abb. 3: Myzelrockengewichte, pektolytische und cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate unter dem Einfluß verschiedener G-Quellen (P = Pektin, G = Glukose, C = Cellulose, M = Maltzin)

der Kombination Pektin-Maltzin zu einer befriedigenden Pektinaseausbeute, während sich bei einem Hefezusatz alle Varianten mit Pektinzusatz durch eine hohe pektolytische Aktivität auszeichneten.

Während Pektin als Induktor für die pektolytischen Enzyme wesentlich war, wurde die C_x -Aktivität durch Zugabe von Cellulose (CMC) nicht gefördert. Entscheidend für eine gute Cellulaseausbeute war der Hefeanteil des Nährsubstrates (vergl. NORKRANS und ASCHAN 1953, REESE und MANDELS 1963). Maltzin hatte auf Grund seines Vitamingehaltes eine ähnlich gute Wirkung. Deutlich kam der Hefeeinfluß in den Varianten mit hohem Glukosegehalt zum Ausdruck. Ohne Hefeextrakt kam es hier nur zu einer geringen Myzelproduktion und minimalen C_x -Aktivität. Beides wurde jedoch durch 0,1 % Hefeextrakt in der Nährlösung drastisch gesteigert. Auffallend war, daß C. herpotrichoides - im Gegensatz zu anderen Pilzen - selbst bei einem so hohen Glukoseanteil wie 2 bzw. 3 % in der Nährlösung nicht mit einer verminderten Cellulasesynthese reagierte.

Die Ergebnisse dieses Versuches lassen den Schluß zu, daß die Pektinasen weitgehend adaptiv gebildet werden, während es sich bei der Cellulase um ein mehr oder weniger konstitutives Enzym handelt. Da wir die Bildung beider Enzyme unter gleichen Bedingungen untersuchen wollten, wählten wir eine Kombination von Pektin und Maltzin (je 0,5 %) als C-Quelle, was eine befriedigend hohe Synthese beider Enzyme gewährleistete.

2.2. Prüfung verschiedener pH-Werte

Da die Enzymsynthese nur innerhalb eines begrenzten pH-Bereichs in voller Stärke abläuft, wurde die Entwicklung der pektolytischen und cellulolytischen Aktivität und die Myzelproduktion bei unterschiedlichen pH-Werten über einen Zeitraum von 6 Wochen verfolgt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nicht die während der Versuchsdauer synthetisierte Enzymmenge erfaßt wurde, sondern lediglich die zum Untersuchungszeitpunkt vorliegende Enzymaktivität. Es ist nicht auszuschließen, daß die Gesamt-Enzymmenge den hemmenden und fördernden Einflüssen von Stoffwechselprodukten und Komponenten aus der Nährlösung unterliegt. Außerdem ist im

Verlauf der Kulturdauer auch ein Abbau der gebildeten Enzyme denkbar. Um den oft mit zunehmender Kulturdauer beobachteten pH-Anstieg des Nährmediums auszuschließen (vgl. dazu SHERWOOD 1966, PANDEY und GUPTA 1966), verwendeten wir ein gepuffertes Nährsubstrat (0,2 M Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN). Als Ausgangswerte wurden pH 4,8, pH 5,4 und pH 6,2 (jeweils nach dem Autoklavieren gemessen) gewählt. Ein ungepuffertes Nährmedium mit einem Ausgangswert von pH 5,4 wurde in den Vergleich mit einbezogen.

Die folgenden Abb. 4-7 geben die Myzelproduktion, die pH-Veränderungen und die gefundenen Enzymaktivitäten im Zeitraum von 2-6 Wochen in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Nährsubstrates wieder. Die Auswertung zeigte, daß C. herpotherpoides in den Nährlösungen mit tieferem pH-Wert größere Myzelmenngen produzierte (Abb. 4).

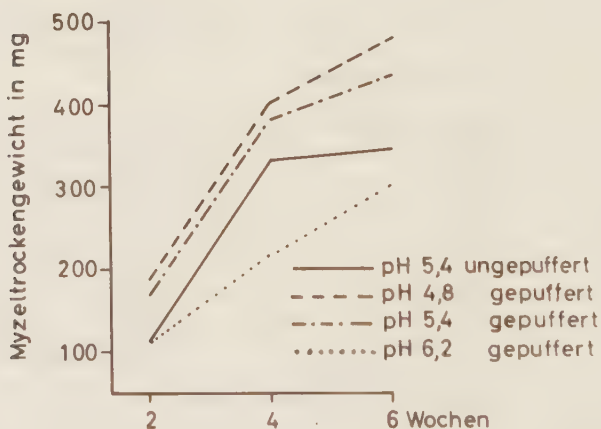


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Myzelbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Nährsubstrats

Die hier gebildeten Kolonien waren gleichmäßig geformt und von typisch mausgrauer Farbe. Im Gegensatz dazu war die Myzeldecke in den Nährlösungen mit höheren pH-Werten mehr oder weniger gewellt und wies eine etwas hellere Farbe auf.

Der pH-Wert der ungepufferten Lösung stieg innerhalb der Versuchsdauer von pH 5,4 auf pH 6,4 an (Abb. 5).

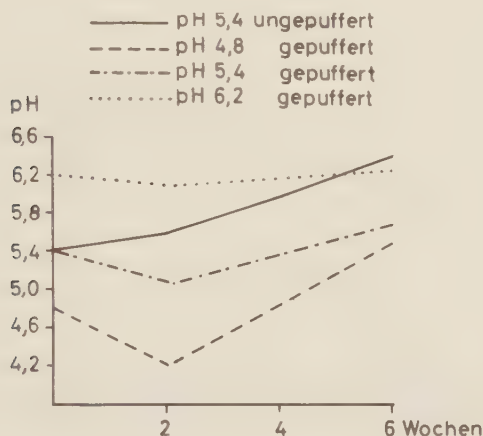


Abb. 5: Entwicklung der pH-Werte in Nährlösungen unterschiedlichen Ausgangsniveaus

In den gepufferten Nährlösungen konnte keine so starke pH-Verschiebung beobachtet werden. Hier sanken die pH-Werte in den ersten beiden Wochen nur leicht ab und stiegen dann bis zum Versuchsende auf etwa pH 5,8 an. Kulturfiltrate mit einem Ausgangswert von pH 4,8 erbrachten von allen Varianten stets die höchste pektolytische Aktivität (Abb. 6). Die nach 4 Wochen erreichte Aktivität erfuhr mit einer Verlängerung der Kulturdauer um 2 weitere Wochen keine wesentliche Veränderung mehr. Die Aktivität der auf pH 5,4 eingestellten Lösung erbrachte bei allen Untersuchungszeitpunkten Werte, die nur geringfügig unter denen von pH 4,8 lagen. In der ungepufferten und in der auf pH 6,2 eingestellten Nährlösung ließen sich selbst nach einer 6-wöchigen Bebrütung nur unbedeutende pektolytische Aktivitäten ermitteln. Die pH-Werte dieser beiden Varianten bewegten sich offenbar in einem Bereich, in dem nur eine geringe Enzymproduktion möglich war.

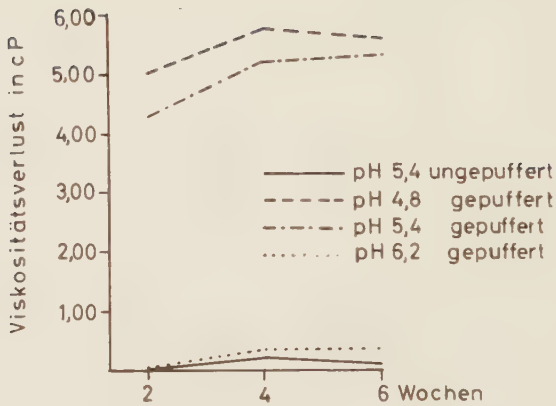


Abb. 6: Entwicklung der pektolytischen Aktivität im Zeitraum von sechs Wochen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Nährlösung (Viskositätsverlust einer 1,6 %igen Pektinlösung während 30 Min. bei pH 4,5 und 30°C)

Zur Erzielung einer hohen cellulolytischen Aktivität erwies es sich günstiger, den Pilz in einer Nährlösung mit dem pH-Wert 5,4 statt pH 4,8 zu kultivieren (Abb. 7).

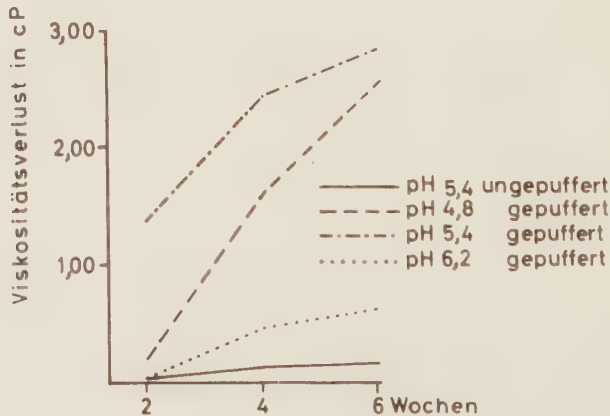


Abb. 7: Entwicklung der cellulolytischen Aktivität im Zeitraum von 6 Wochen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Nährlösung (Viskositätsverlust einer 0,8%igen CMC-Lösung während 45 Min. bei pH 6,0 und 30°C)

Bis zu 4-wöchiger Kulturdauer waren die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Varianten auffallend groß, während sie sich nach 6 Wochen nur noch wenig voneinander unterschieden. Vermutlich lag der pH-Wert in der Lösung von pH 4,8, der in den ersten beiden Wochen noch auf pH 4,2 absank, während dieses Zeitraumes in einem für die Cellulasebildung ungünstigen Bereich. Erst ein Anstieg des pH-Wertes in der folgenden Zeit schuf dann günstigere Voraussetzungen. Die cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate aus dem ungepufferten und dem auf pH 6,2 eingestellten Nährmedium war gering.

Die Erhöhung des pH-Wertes der Nährlösung mit fortschreitender Kulturdauer ist sicherlich nicht die alleinige Ursache, die einer weiteren Aktivitätserhöhung entgegenwirken kann. Stoffwechselprodukte des Pilzes sowie eine Verarmung des Substrates an Nährstoffen dürften hier auch eine Rolle spielen.

3. Enzymatische Aktivität nach unterschiedlichen Kulturbedingungen

3.1. Vorkultur des Inokulums

Um zu prüfen, ob eine vorherige Adaption des Pilzes an Pektin und Cellulose für ein späteres Aufschließen dieser Substrate förderlich ist, wurde der Pilz über einen Zeitraum von 12 Wochen auf dem üblichen Agar kultiviert, dem jedoch an Stelle von Maltzin als C-Quellen Pektin bzw. CMC in einer 1%igen Konzentration zugefügt waren. Die Abbauleistung des auf dem üblichen Substrat (mit 1% Maltzin) angezogenen Pilzes diente als Bezugsbasis. Für diesen Versuch wurden die Stämme 194, 98/2 und 196 ausgewählt. Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit auf diesen verschiedenen Nährsubstraten waren nicht zu verzeichnen, lediglich die Ausbildung von Luftmyzel war auf dem Celluloseagar verringert. Nährlösungen, die 0,5% Pektin und 0,5% Cellulose enthielten, wurden dann mit Myzel von diesen drei verschiedenen Nährböden beimpft und nach einer Kulturdauer von vier Wochen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität herangezogen. Wie aus Abb.8 hervorgeht, wurde weder das

Myzelgewicht durch die Art der Vorkultur entscheidend verändert, noch wurde die Fähigkeit des Pilzes, Pektin und Cellulose enzymatisch aufzuschließen, verbessert.

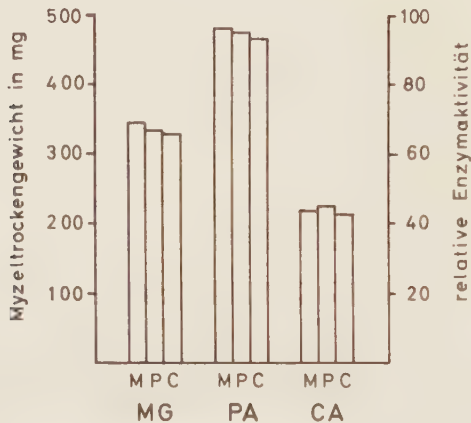


Abb. 8: Einfluß der Vorkultur des Inokulums auf Myzelgewichte sowie enzymatische Aktivität 4-Wochen alter Kulturfiltrate (Stamm 194)
M = Meltzin-Agar, P = Pektin-Agar, C = Cellulose-Agar, MG = Myzeltrockengewicht, PA = Pektolytische Aktivität, CA = Cellulolytische Aktivität

Die mit Stamm 194 erzielten Ergebnisse fanden mit den beiden anderen Stämmen ihre Bestätigung; auch bei ihnen ließ sich keinerlei Einfluß der Vorkultur des Inokulums auf die Myzelproduktion sowie auf die Abbauleistungen erkennen.

3.2. Einfluß der Kulturdauer

Als nächstes sollte das zeitliche Maximum der Enzymaktivität in einem gepufferten Nährsubstrat ermittelt und die Myzelbildung und die Entwicklung des pH-Wertes verfolgt werden. Mit zwei Stämmen - 194 und 98/2 - wurde dieser Versuch durchgeführt. Nährlösungen aus einem Ansatz wurden so beimpft, daß zu einem bestimmten Termin gleichzeitig eine Auswertung 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen alter Kulturen vorgenommen werden konnte (Abb. 9). Die Myzelgewichte beider Stämme stiegen in den ersten 4 Wochen steil an. Bis zum Maximum, das nach 6 Wochen erreicht war, war nur noch ein

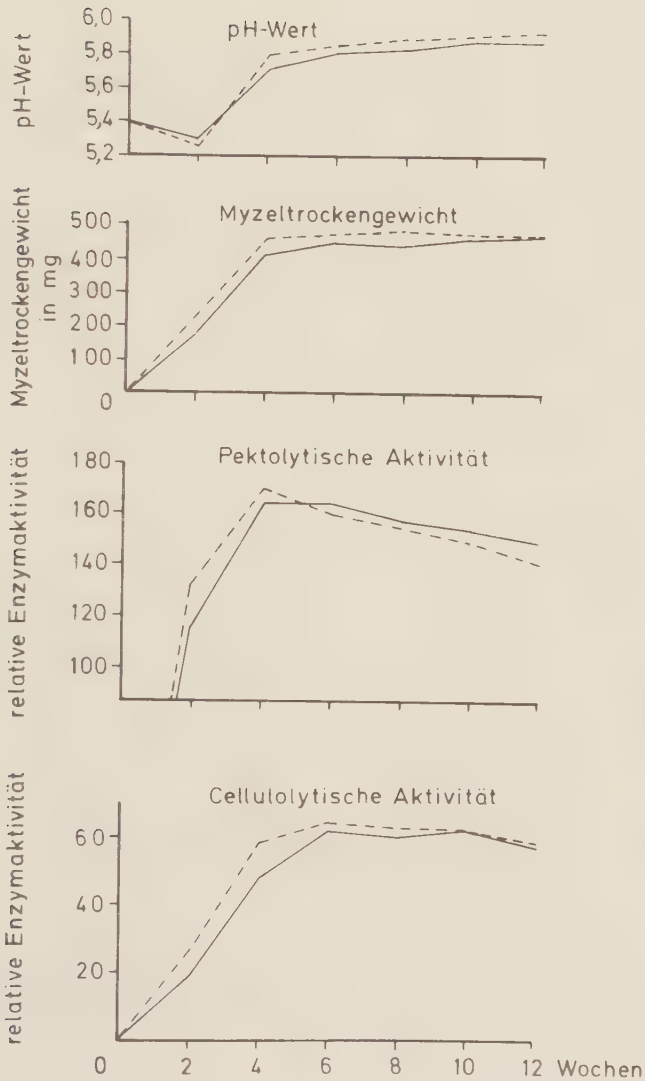


Abb. 9: pH-Wert-Veränderung des Nährmediums, Myzelproduktion und Enzymsynthese zweier Stämme (194 — und 98/2 ----) im Verlauf von 12 Wochen

geringer Myzelzuwachs zu beobachten. Im weiteren Verlauf des Versuchs war keine wesentliche Veränderung der Myzelgewichte mehr festzustellen. Stamm 98/2 hob sich durch eine höhere Myzelproduktion von Stamm 194 ab. Stärkere Schwankungen des pH-Wertes des Nährmediums wurden durch die Pufferung (0,2 M Phosphatpuffer) vermieden. In den ersten beiden Wochen sank der pH-Wert leicht ab, erhöhte sich in den folgenden zwei Wochen und stieg zum Versuchsende hin nur noch langsam an. Dabei fiel die größte pH-Erhöhung mit dem Abschnitt der stärksten Enzymproduktion des Pilzes zusammen. Stamm 98/2, der auf Grund seiner größeren Myzelproduktion eine verstärkte Stoffwechselaktivität vermuten ließ, führte im Vergleich zu Stamm 194 eine beschleunigte Erhöhung des pH-Wertes herbei.

Bereits nach 2 Wochen Inkubationszeit konnte in den Kulturfiltraten beider Stämme eine beachtliche pektolytische Aktivität nachgewiesen werden, die bis zum 4-wöchigen Untersuchungszeitpunkt noch anstieg. Dabei zeichnete sich Stamm 98/2 gegenüber Stamm 194 durch eine stärkere Enzymproduktion in der Anfangsphase aus. Mit verlängerter Versuchsdauer nahm die pektolytische Aktivität leicht ab. Dabei setzte der Abfall zuerst bei Stamm 98/2 ein. Zu diesem Zeitpunkt lag ein pH-Wert von 5,78 in der Nährlösung vor. Auffallend war, daß der Aktivitätsverlust bei Stamm 194 ebenfalls nach Erreichen eines pH-Wertes um 5,8 einsetzte.

Die cellulolytische Aktivität stieg bis zu einer Wachstumsdauer von 6 Wochen steil an. Mit längerer Kulturdauer traten nur noch leichte Aktivitätsveränderungen auf. Auch hier zeichnete sich Stamm 98/2 durch eine stärkere Enzymproduktion als Stamm 194 innerhalb der ersten 4 Wochen aus. Im Gegensatz zur pektolytischen Aktivität erfuhr die cellulolytische Aktivität mit verlängerter Kulturdauer keine Minderung.

3.3. Schüttelkultur

In einem weiteren Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch Ruhe- oder Schüttelkulturen eine höhere Enzymausbeute zu erreichen ist. Weiterhin wurden bei der Ruhekultur zwei Varianten unterschieden: Oberflächliche

Bildung einer Myzeldecke einerseits, submerses Pilzwachstum andererseits.

Die Myzelausbildung verlief in den Varianten recht unterschiedlich. Während sich bei der Ruhekultur (Oberflächenkultur) nach vier Wochen eine dichte, grau gefärbte Myzeldecke entwickelt hatte, war das Myzel der Schüttelkultur durch eine große Anzahl schwarzer Myzelballen mit einem Durchmesser von etwa 0,5-1,0 cm gekennzeichnet. Die Submerskultur ließ nur die Ausbildung dünner, geflockter, gelblich getönter Myzelien zu. Diese unterschiedliche Myzelentwicklung drückt sich auch in den gefundenen Myzelgewichten aus.

Welche Enzymaktivitäten und Myzelmenngen in den einzelnen Varianten ermittelt wurden, veranschaulicht Abb. 10.

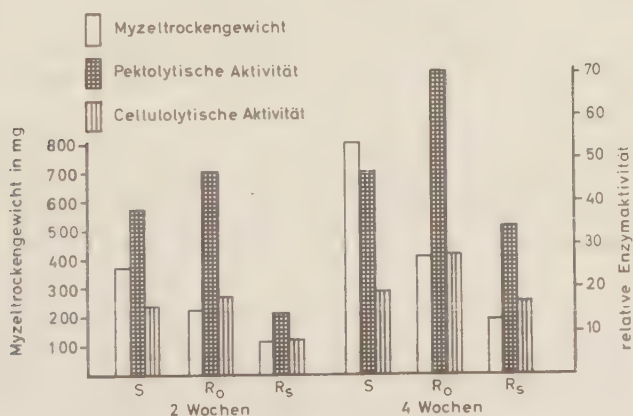


Abb. 10: Vergleich der pektolytischen und cellulolytischen Aktivität der Kulturfiltrate von Schüttel- und Ruhekulturen (S = Schüttelkultur, R₀ = Ruhekultur/Oberflächenkultur, R_S = Ruhekultur/Submerskultur)

Aus dieser Zusammenstellung läßt sich entnehmen, daß die Ruhekultur der Schüttelkultur - trotz ihres geringeren Myzelgewichtes - dann überlegen ist, wenn sich ein Oberflächenmyzel entwickelt. Deshalb wurde beim Beimpfen der Kolben darauf geachtet, daß die Impfstücke auf der Nährlösung schwammen.

Die geringere enzymatische Aktivität der Schüttelkultur könnte ihre Ursache in einer mechanischen Zerstörung schon gebildeter Enzyme haben. Um dies zu überprüfen, wurden Kulturfiltrate 15 bzw. 30 Stunden auf einem Schüttler mit 100 Umdreh./ Min. geschüttelt. Als Kontrolle diente eine ungeschüttelte Enzymprobe. Bei einem Vergleich der Abbaukurven zeigte sich, daß weder die pektolytische noch die cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate durch das Schütteln beeinträchtigt wurden. Die Möglichkeit, daß Schütteln über einen noch längeren Zeitraum schädigend wirkt, kann damit allerdings nicht ausgeschlossen werden.

3.4. Lichteinfluß

Angaben über den Lichteinfluß auf die Synthese zellwandzerstörender Enzyme liegen nur in geringem Ausmaße vor. Während MANDELS (1950), BeMILLER et al. (1968) und WÄLCHLI (1968) sich in ihren Untersuchungen lediglich auf cellulolytische Enzyme beschränkten und hierbei fanden, daß ständige Belichtung je nach Pilzart eine hemmende, fördernde oder auch keine Wirkung ausübte, berücksichtigten wir zusätzlich pektolytische Enzyme.

Zu dieser Untersuchung verwendeten wir die Stämme 194 und 98/2. Geprüft wurden zwei und vier Wochen alte Kulturfiltrate. Um sicher zu gehen, daß auftretende Aktivitätsunterschiede nicht auf Temperatureinflüsse zurückzuführen waren, kontrollierten wir in allen Kolben am Versuchsende die Temperatur. Dabei stellte sich heraus, daß die Kulturfiltrate der belichteten Kolben eine um $0,8^{\circ}\text{C}$ höhere Temperatur aufwiesen als die mit Aluminiumfolie umwickelten Kontrollen. Diese geringe Differenz erschien uns jedoch bedeutungslos, so daß wir die aufgetretenen Aktivitätsunterschiede alleine auf die Lichteinwirkung zurückführten.

Die Aktivität beider untersuchter Enzyme war zu beiden Untersuchungszeitpunkten günstig beeinflusst worden (Abb. 11). Dabei war die Förderung nach vier Wochen stärker als nach 2 Wochen. Eine unterschiedliche Myzelproduktion war nicht zu verzeichnen. Beide untersuchten Stämme reagierten in ähnlicher Weise auf die Belichtung.

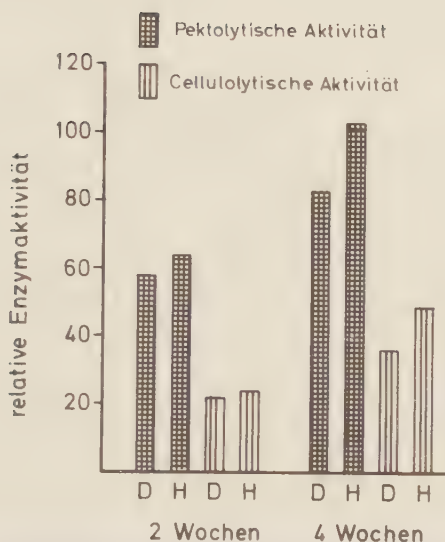


Abb. 11: Einfluß der Dauerbeleuchtung auf die pektolytische und cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate (Stamm 194; D = Dunkel, H = Hell)

3.5. Temperatureinfluß

Der Einfluß der Temperatur auf Myzelwachstum, Myzelgewicht und Enzymproduktion wurde am Beispiel von vier Stämmen untersucht. Dabei wurden Isolate von Weizen (98/2, 6/1), Gerste (194) und Roggen (43/1) berücksichtigt. Auffallend war, daß das Roggenisolat auf tiefere Temperaturen besser anspricht. Für das Myzelwachstum auf Agar war für Stamm 43/1 eine Temperatur von 15°C optimal, während für die untersuchten Weizen- und Gerstenherkünfte höhere Temperaturen wachstumsfördernd waren (Tab. 3 und Abb. 12).

Bei der Ermittlung der Myzelgewichte konnte die gleiche Tendenz beobachtet werden (Abb. 13). Die Erhöhung der Temperatur von 5°C auf 15°C hatte bei Weizen- und Gerstenisolaten den steilsten Anstieg des Myzelgewichtes auf etwa 500 mg zur Folge. Weitere Temperatursteigerungen blieben

Tab. 3: Koloniedurchmesser (in mm) von vier Stämmen von C. herpotrichoides nach 15 Tagen bei unterschiedlichen Temperaturen auf abgeändertem Czapek-Dox-Agar.

Stamm	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
43/1	16	23	33	30	12
6/1	21	32	50	57	46
98/2	17	28	50	57	52
194	28	35	51	57	36

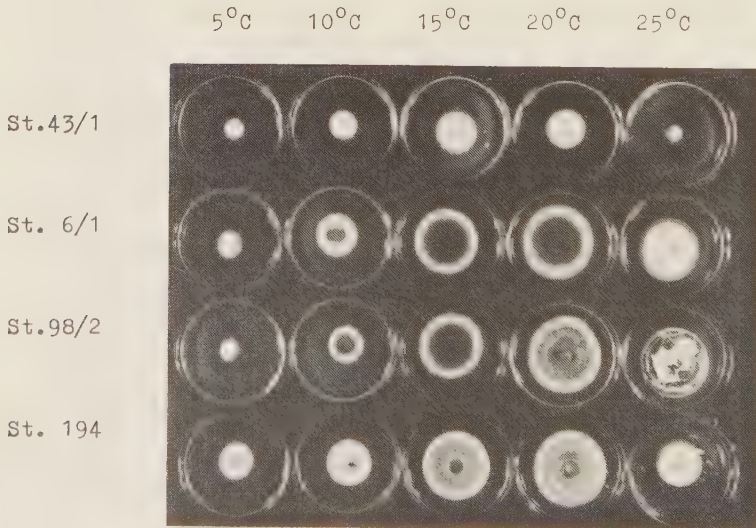


Abb. 12: Wachstum von vier Stämmen von Cercospora herpotrichoides bei unterschiedlichen Temperaturen auf einem abgeänderten Czapek-Dox-Agar (vgl. Tab. 3).

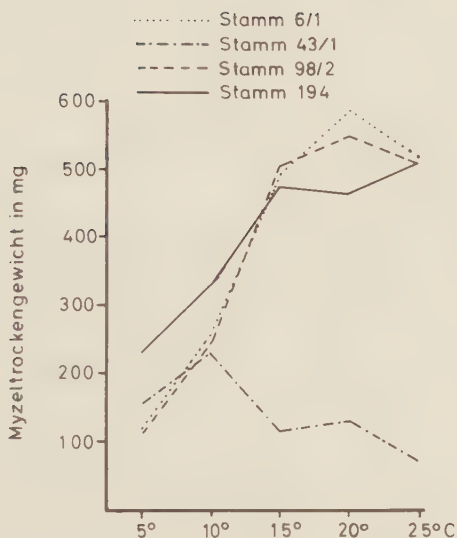


Abb. 13: Myzeltrockengewichte von 4 Stämmen von Cercospora herpotrichoides in Abhängigkeit von der Anzuchttemperatur

ohne wesentlichen Einfluß. Das Roggenisolat bildete schon bei 10°C die höchste Myzelmenge, die jedoch nur etwa 200mg betrug.

Hinsichtlich der Enzymproduktion reagierten die vier Isolate entsprechend. Ihre Aktivität nach einer Inkubationszeit von vier Wochen ist in Abb.14 und 15 dargestellt. Stamm 43/1 schied im tieferen Temperaturbereich sowohl Pektinasen als auch Cellulasen verstärkt in das Kulturfiltrat ab. Die Stämme 6/1 und 98/2 reagierten entgegengesetzt. Bei ihnen führten höhere Temperaturen zu einer größeren Enzymproduktion, während Stamm 194 im gesamten erfaßten Temperaturbereich eine annähernd gleich gute Enzymausbeute zeigte.

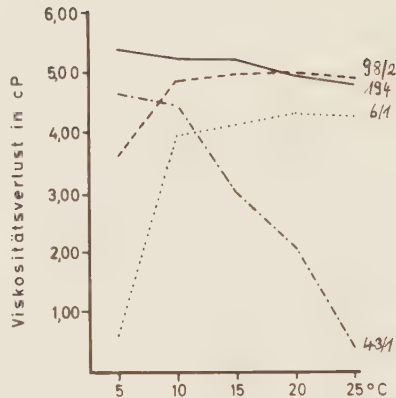


Abb. 14

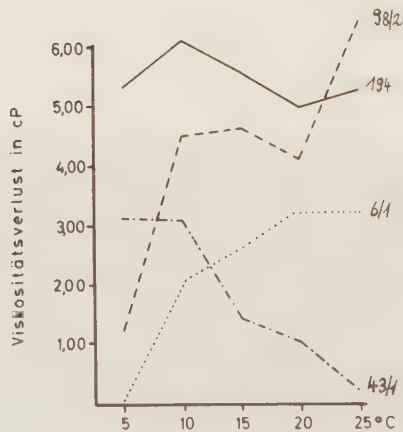


Abb. 15

Abb. 14: Pektolytische Aktivität der Kulturfiltrate von 4 Stämmen von *C. herpotrichoides* in Abhängigkeit von der Anzuchttemperatur (Viskositätsverlust einer 1,6 %igen Pektinlösung während 30 Min. bei pH 4,5 und 30 °C)

Abb. 15: Cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate von 4 Stämmen von *C. herpotrichoides* in Abhängigkeit von der Anzuchttemperatur (Viskositätsverlust einer 0,8 %igen CMC-Lösung während 45 Min. bei pH 6,0 und 30 °C)

4. Beeinflussung der Aktivität der Kulturfiltrate

4.1. Einfluß der Pufferung

Es galt nun für den viskosimetrisch erfaßbaren Pektin- und Celluloseabbau einen Puffer auszuwählen, der die Enzymaktivität unbeeinflußt ließ. Die folgenden Puffersysteme (für den Pektinabbau pH 5,0; für den Celluloseabbau pH 6,0) wurden in den Versuch einbezogen:

Azetatpuffer

Phosphatpuffer (nach SÖRENSEN)

Citrat-Phosphatpuffer (nach McILVAINE)

Citratpuffer

Die Konzentration während des Meßvorganges betrug 0,1 M. Die in ungepufferten Substratlösungen erzielten Ergebnisse wurden zum Vergleich herangezogen.

Wie Abb. 16 veranschaulicht, konnte das Ausmaß des Pektinabbaus durch die verwendeten Puffersysteme beeinflusst werden (vgl. hierzu MAYER et al. 1964).

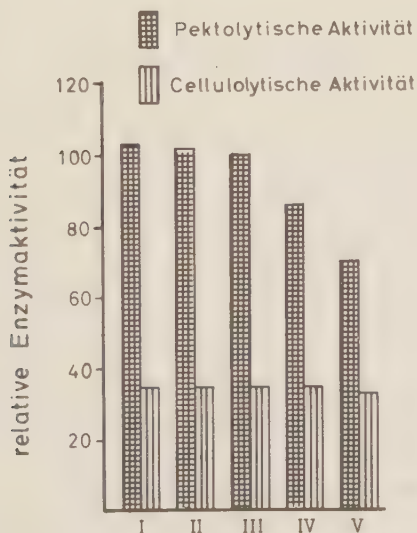


Abb. 16: Einfluß verschiedener Puffer (0,1 M) auf die pektolytische und cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate (I = ungepuffert, II = Phosphatpuffer, III = Azetatpuffer, IV = Citrat-Phosphatpuffer, V = Citratpuffer)

Äzetatpuffer und Phosphatpuffer beeinträchtigten in der gewählten Molarität den Pektinabbau im Vergleich zu ungepuffert nicht. Die beiden anderen Puffersysteme wirkten sich negativ aus, wobei mit Erhöhung des Citratanteiles (Citratpuffer) ein stärkerer Hemmeffekt verbunden war. In höheren Molaritäten führten aber auch Äzetat- und Phosphatpuffer zu einer Minderung des Pektinabbaues. Die cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate wurde durch die Art der Pufferung in keiner Weise beeinträchtigt. Offensichtlich war die C_x -Cellulase wenig empfindlich gegenüber hemmenden Faktoren (vgl. REESE 1959).

4.2. Vorbehandlung der Kulturfiltrate

Die pektolytische und die cellulolytische Aktivität unbehandelter Kulturfiltrate wurde mit der von dialysierten und eingengten Kulturfiltraten verglichen. Dabei wiesen die Kulturfiltrate nach dem Dialysieren eine höhere pektolytische Aktivität auf als die entsprechenden undialysierten Parallelen.

Der langsamere Pektinabbau bei der Verwendung undialysierter Kulturfiltrate könnte seine Ursache in der Hemmung der Substratspaltung durch pilzliche Stoffwechselprodukte, die durch Dialyse entfernbare sind, haben. Denkbar wäre aber auch, daß die Salzkonzentration im Reaktionsgemisch durch das undialysierte Kulturfiltrat und die gepufferte Substratlösung derart erhöht war, daß sie hemmend auf die pektolytische Enzyme einwirkte. Dafür sprach auch die Tatsache, daß der Pektinabbau in stärker als 0,1M gepufferten Substraten langsamer verlief.

Bei der Verwendung von undialysierten Kulturfiltraten, die zur Aktivitätserhöhung im BUCHI-Rotationsverdampfer auf die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens eingengt waren, konnte nicht die erwartete Steigerung der pektolytischen Aktivität erzielt werden. Eine Beschleunigung des Pektinabbaues trat erst nach dem Dialysieren der eingengten Proben auf. Offensichtlich wurden die durch das Einengen des Kulturfiltrates angereicherten hemmenden Stoffe durch den Dialysiervorgang entfernt. Nach diesen Ergebnissen war zu erwarten, daß man dieselbe Aktivität erreicht, wenn man die hemmenden Stoffe zunächst durch Dialysieren entfernt und dann

durch Einengen die Enzymkonzentration erhöht. Es zeigte sich, daß tatsächlich dieselben Werte erreicht wurden. In Abb. 17 sind diese Ergebnisse zusammengefaßt.

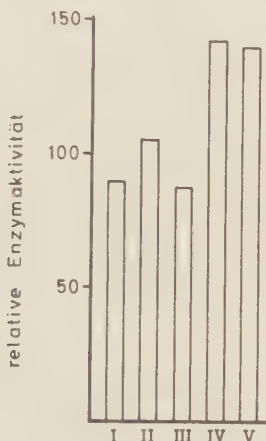


Abb. 17: Einfluß der Dialyse und des Einengens der Kulturfiltrate auf die pektolytische Aktivität (I = undialysiert, II = dialysiert, III = undialysiert, anschließend eingeengt, IV = undialysiert eingeengt, anschließend dialysiert, V = dialysiert, anschließend eingeengt)

Die cellulolytische Aktivität der Kulturfiltrate wurde - im Gegensatz zur pektolytischen Aktivität - durch den Dialysiervorgang vermindert. Die Verwendung eingeengter Kulturfiltrate führte zu einer Beschleunigung des CMC-Abbaues. Diese erhöhte Aktivität der doppelt konzentrierten Filtrate wurde jedoch durch die Dialyse wieder aufgehoben (Abb.18).

Da bekannt ist, daß die Cellulase an ihre unlöslichen Substrate adsorbiert werden kann (HALLIWELL 1961), vermuteten wir, daß ein Teil des Enzymes von Cellulosebestandteilen des Dialysierschlauches (Fa. Kalle AG., Wiesbaden-Biebrich, Produkt aus Cellulosehydrat) festgelegt wurde. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, gaben wir 50ml undialysiertes Kulturfiltrat zu unterschiedlichen Mengen von fein zerkleinertem Dialysierschlauch. Nach einer Einwirkungszeit von 10 bzw. 20 Stunden bestimmten wir viskosimetrisch die Enzymaktivität. Aus Tab.4 ist eine deutliche Minderung

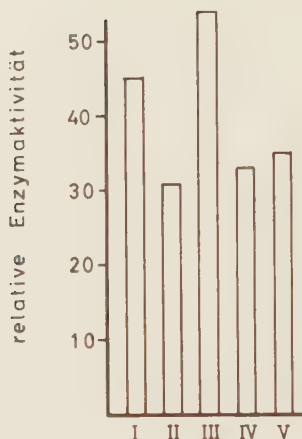


Abb. 18: Einfluß der Dialyse und des Einengens der Kulturfiltrate auf die cellulolytische Aktivität (I = undialysiert, II = dialysiert, III = undialysiert, anschließend eingeengt, IV = undialysiert eingeengt, anschließend dialysiert, V = dialysiert, anschließend eingeengt)

Tab. 4: Beeinflussung der C_x -Aktivität durch Adsorption an Cellulose-Material (Dialysierschlauch) in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer
Viskositätsverlust der Kontrolle (ohne Dialysierschlauch) 3,2 cP = 100
Abbau 30 Min. bei 30°C, pH 6,0

Zusatz von zerkleinertem Dialysierschlauch in mg	Einwirkungszeit	
	10 Std.	20 Std.
0	100	100
150	92	80
300	78	68

der C_x -aktivität, deren Ausmaß von der Menge an Adsorptionsmaterial und der Länge der Einwirkungszeit abhängig war, zu entnehmen. Die pektolytische Aktivität blieb unbeeinflusst.

5. Charakterisierung der pektolytischen Enzyme

5.1. Polygalakturonase (PG)

Bei viskosimetrischen Messungen besteht die Möglichkeit, daß transeliminative Spaltungen der Substratmoleküle mit erfaßt werden. In unseren Versuchen war jedoch, wie später gezeigt wird, in den für die PG-Aktivität günstigen pH-Bereichen keine transeliminative Aktivität vorhanden, so daß in diesem Falle allein Hydrolasen für den Viskositätsverlust verantwortlich gemacht werden konnten. Je nach Angriffspunkt der Enzyme am Substratmolekül entstehen Abbauprodukte unterschiedlicher Molekülgröße.

Für eine nähere Charakterisierung des vorliegenden Enzyms ist es bedeutungsvoll zu wissen, ob Pektin oder Pektinsäure bzw. Pektat bevorzugt abgebaut werden.

5.1.1. Substratspezifität bei verschiedenen pH-Werten

Die Frage der Substratspezifität wurde geklärt, indem der Abbau von Pektin im Bereich von pH 3-8 und der des Pektats von pH 4-8 verfolgt wurde.

Eine Messung der Pektatspaltung bei tieferen Werten als pH 4,0 unterblieb, da hier die Substratlösung gelierte und dadurch für die viskosimetrische Messung unbrauchbar war. Die Viskosität der Substrate war bei gleichbleibender Konzentration, wie Abb. 19 für Pektin verdeutlicht, vom pH-Wert abhängig.

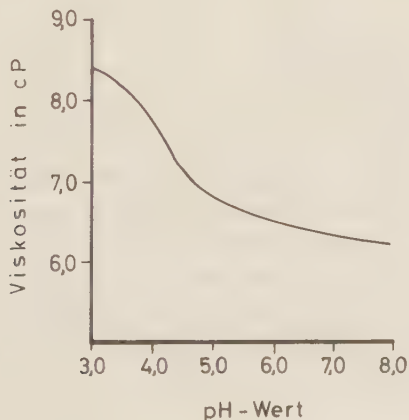


Abb. 19: Abhängigkeit der Viskosität einer 1,6 %igen Pektinlösung vom pH-Wert

Da diese Viskositätsveränderungen zwangsläufig bei der Ermittlung des pH-Optimums auftraten, mußte darauf geachtet werden, daß sowohl die aktive als auch die inaktive Probe während des Meßvorganges den gleichen pH-Wert aufwiesen.

Viskosimetrische Untersuchungen ergaben, daß sowohl Pektin als auch Pektat als Substrat geeignet waren. Dabei zeigte sich, daß Pektin bei pH 4,0 und 4,5 schneller abgebaut wurde. Zu berücksichtigen ist, daß die verwendeten Kulturfiltrate - wie in einem späteren Kapitel beschrieben wird - als weitere Enzymkomponente eine Pektinmethylesterase (PME) enthielten, die das Pektin nach einer Demethoxylierung als Substrat für pektatspaltende Enzyme verwertbar macht. Eine wesentliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Einwirkung der PME war jedoch nicht anzunehmen, da die PME-Aktivität gerade im niederen Bereich geringer als im Neutralbereich war.

Für den Pektatabbau ergab sich ein Optimalbereich von pH 5,0 - 5,5. Abb. 20 gibt die gefundenen Aktivitäten - ausgedrückt in relativen Aktivitäten - wieder.

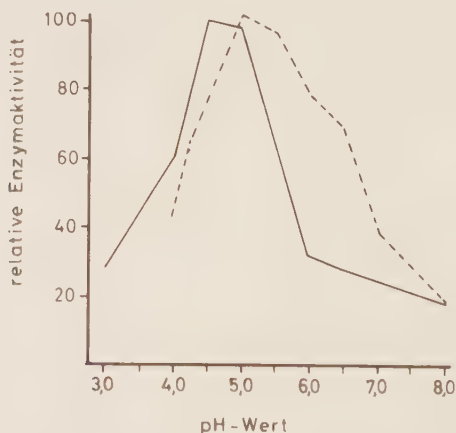


Abb. 20: Abbau von Pektin (—) und Pektat (- - -) in Abhängigkeit vom pH-Wert (viskosimetrische Methode)

Beim Vergleich der von C.herpotrichoides gebildeten Aktivitäten mit denen anderer Pilze ergab sich, daß C.herpotrichoides verhältnismäßig geringe pektolytische Aktivitäten entwickelte. Mit Hilfe reduktometrischer Methoden gelang es erst nach einer Ausdehnung der Inkubationszeit auf 4 Stunden (bei 30°C), Spaltungen der Substratketten nachzuweisen (Tab. 5).

Tab. 5: Reduktometrische Bestimmung der pektolytischen Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH	Freisetzung reduzierender Gruppen in α -Äquivalenten nach NELSON (1944)		nach KERTESZ (1955)	
	Pektin	Pektat	Pektin	Pektat
4,0	12,8	10,6	12,9	5,0
4,5	31,7	30,0	32,9	15,4
5,0	31,7	40,6	32,0	34,4
5,5	29,5	38,4	28,9	34,7
6,0	18,4	32,2	24,7	24,8
6,5	17,8	31,0	-	-
7,0	17,3	21,1	16,5	21,6
7,5	15,1	0	12,5	13,3
8,0	0	0	9,5	11,3
8,5	0	0	5,5	5,0

Die mit diesen Methoden gefundenen Ergebnisse stimmten mit den viskosimetrisch ermittelten Werten überein. In beiden Fällen war für den Pektinabbau ein Optimalbereich von pH 4,5 - 5,0 und für den Pektatabbau von pH 5,0 - 5,5 nachgewiesen worden. Wahrscheinlich lagen im Kulturfiltrat von C.herpotrichoides mindestens zwei pektolytische Enzyme des Polygalakturonase-Typs vor, die sich in ihrer Substratspezifität sowie ihren pH-Optima unterschieden. Angaben über den Angriffspunkt der Enzyme innerhalb des Substratmoleküles lassen sich aus diesen Ergebnissen noch nicht machen. Erst nach Kenntnis der Abbauprodukte läßt sich diese Frage beantworten.

5.1.2. Beeinflussung der PG-Aktivität

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluß hoher Temperaturen und extremer pH-Werte auf die Aktivität der nach den viskosimetrischen Verfahren im Kulturfiltrat unterschiedenen Enzymkomponenten bestimmt. Da sowohl die pektin- als auch die pektatspaltende Komponente auf Temperatur- und pH-Einflüsse in gleicher Weise reagierten, werden in den folgenden Abbildungen lediglich die Versuche, in denen Pektin als Substrat verwendet wurde, behandelt.

a) Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität des Enzymes war sehr gering. Schon 30-minütiges Erhitzen auf 40°C verminderte die Aktivität um mehr als 50 % (Abb. 21). Eine Behandlung von 60°C führte nach 30 Min. zu einer restlosen Inaktivierung des Enzyms.

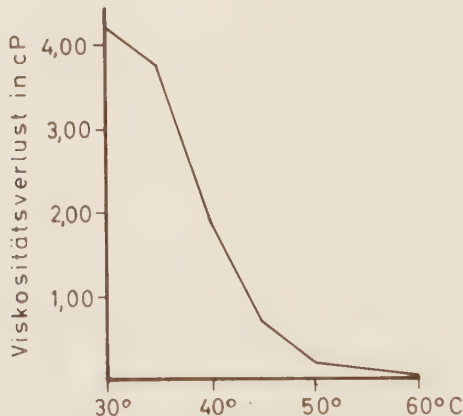


Abb. 21: Temperaturstabilität der Polygalakturonase (Viskositätsverlust einer 1,6 %igen Pektinlösung während 20 Min. bei pH 4,5 und 30°C)

b) pH-Stabilität

Extreme pH-Werte verringerten die PG-Aktivität der Kulturfiltrate beträchtlich (Abb. 22). Während das 14-stündige Aufstellen der Kulturfiltrate bei pH-Werten zwischen 3 und 9 ohne Einfluß auf die Enzymaktivität blieb, wurde das Enzym durch pH 1 und pH 12 innerhalb von 14 Stunden derart

geschädigt, daß es nur noch zu geringem Substratumsatz befähigt war.

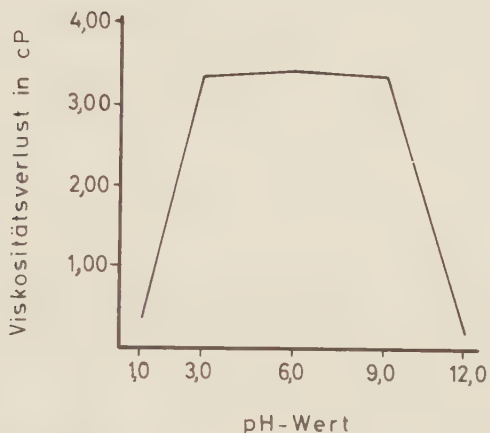


Abb. 22: pH-Stabilität der Polygalakturonase (Viskositätsverlust einer 1,6 %igen Pektinlösung während 20 Min. bei pH 4,5 und 30 °C)

5.2. Transeliminase (PTE)

Bei einer transeliminativen Spaltung des Pektins bzw. des Pektats treten in den Reaktionsprodukten Doppelbindungen auf, die bei einer Wellenlänge von 230-235 nm eine maximale Absorption aufweisen (ALBERSHEIM et al. 1960, STARR und MORAN 1962). Eine weitere Nachweismethode, die aber der Messung bei 230 nm an Genauigkeit unterlegen sein soll (BATEMAN und MILLAR 1966), beruht auf dem Anfärben der Spaltprodukte mit Thiobarbitursäure (NEUKOM 1960). Hierbei entsteht ein roter Farbstoff, der ein Absorptionsmaximum bei 548 nm hat.

Messungen bei diesen Wellenlängen ergaben, daß der Pilz in der verwendeten Nährlösung eine Transeliminase bildet (Tab. 6). Die mit der Methode nach SHERWOOD (1966) gefundenen Ergebnisse bewegten sich in den gleichen Größenordnungen. Die Transeliminase bevorzugte Pektin als Substrat und war bei pH 8,0 wesentlich aktiver als bei pH 5,0. Auf Grund dieses orientierenden Versuches wurde in den wei-

teren Ansätzen lediglich Pektin als Substrat verwendet.

Tab. 6: Nachweis von Pektin- bzw. Pektinsäuretranseliminase im Kulturfiltrat von C.herpotrichoides (nach AYERS et al. 1966).

Substrat	Absorption bei			
	230 nm pH 5,0	550 nm	230 nm pH 8,0	550 nm
Pektin	0,02	0,01	0,46	0,40
Pektat	0,02	0,01	0,08	0,05

5.2.1. Beeinflussung der PTE-Produktion

Zunächst geht es, den Einfluß verschiedener C-Quellen und des pH-Wertes des Nährmediums auf die Transeliminase-Produktion zu ermitteln.

a) Einfluß verschiedener C-Quellen

Pektin (P), Maltzin (M), Glukose (G) und Cellulose (C) wurden alleine (jeweils 1 %) und in verschiedenen Kombinationen (0,5 % + 0,5 %) getestet. Dabei ergab sich beim Vergleich der einzelnen 4 Wochen alten Ansätze folgendes Bild (Abb. 23):

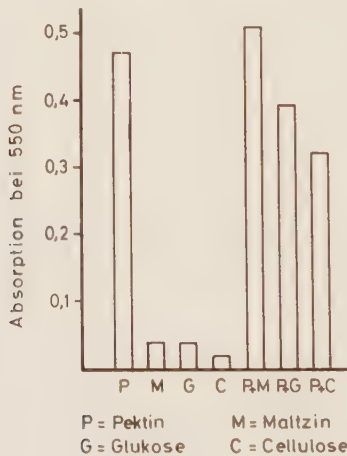


Abb. 23: Einfluß verschiedener C-Quellen auf die PTE-Aktivität der Kulturfiltrate

Für die Bildung der Transeliminase war Pektin als Komponente in der Nährlösung wesentlich. In den Maltzin-, Glukose- und Cellulosevarianten war nur eine geringe Aktivität nachzuweisen, die jedoch durch eine Pektinzugabe um ein Vielfaches gesteigert werden konnte.

b) pH-Einfluß

Die Transeliminaseproduktion bei verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von 6 Wochen gibt Abb. 24 wieder.

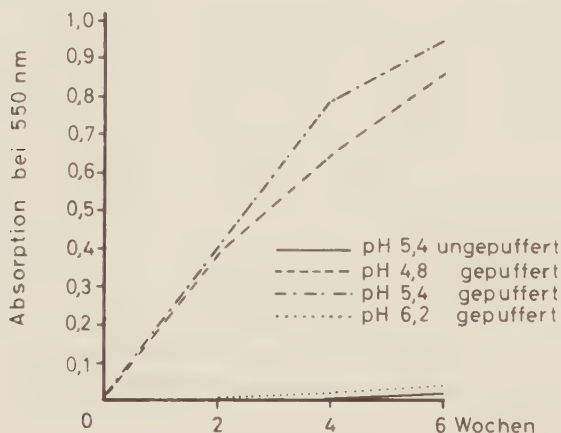


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der PTE-Aktivität der Kulturfiltrate in Abhängigkeit vom pH-Wert der Nährlösung

Es kommt deutlich zum Ausdruck, daß das ungepufferte und das auf pH 6,2 eingestellte Nährmedium keine Synthese dieses Enzyms zulassen, während in den beiden anderen Nährlösungen schon nach zwei Wochen eine beachtliche Aktivität vorlag. Mit zunehmender Versuchsdauer ergab das Medium pH 5,4 die höchste Enzymausbeute.

c) Abhängigkeit von der Kulturdauer

Um das Optimum der PTE-Aktivität in Abhängigkeit vom Kulturalter zu ermitteln, wurde ein Versuch, der sich über 12 Wochen erstreckte, ausgewertet (Abb. 25). Danach wird vom Stamm 194 nach 6 Wochen die optimale PTE-Aktivität erreicht. Eine Verlängerung der Versuchsdauer hat einen

Abfall der Aktivität zur Folge.

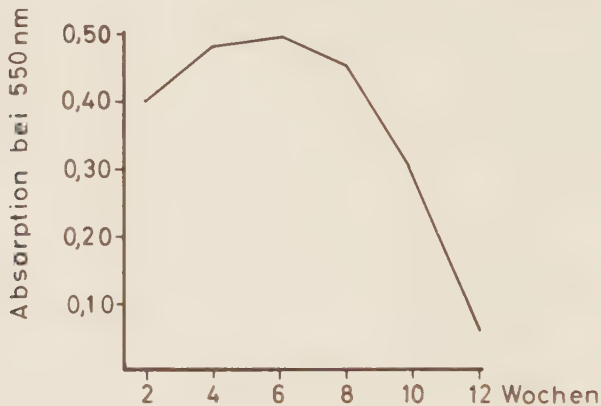


Abb. 25: PTE-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer

5.2.2. Beeinflussung der PTE-Aktivität

a) Einfluß des pH-Wertes und der Pufferung

Das pH-Optimum der Transeliminase sollte in einer gepufferten Substratlösung ermittelt werden. Um zu überprüfen, ob die vorgesehene Pufferung die Ergebnisse beeinflusste, wurde das Substrat mit verschiedenen Puffersystemen unterschiedlicher Molarität gepuffert.

In Tab. 7 kommt zum Ausdruck, daß sowohl die Art als auch die Konzentration des Puffers wesentlich für die Erfassung der PTE-Aktivität waren. Bei pH 5,0 war nur eine unbedeutende transeliminative Pektinspaltung nachweisbar. Bei pH 7,8 wirkte sich der Tris/HCl-Puffer in einer Konzentration von 0,05 M am günstigsten aus, während höhere Molaritäten einen leichten Aktivitätsabfall zur Folge hatten. Die beiden anderen Puffersysteme führten in den getesteten Molaritäten zu wesentlich schlechteren Ergebnissen.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde das pH-Optimum für die transeliminative Substratspaltung in ungepufferten Lösungen bestimmt. Da mit undialysierten Kulturfiltraten keine PTE-Aktivität nachzuweisen war, konnten nur dialysierte

Filtrate Verwendung finden.

Tab. 7: Einfluß der Pufferung auf die PTE-Aktivität
(Methode nach SHERWOOD 1966)

Puffer	pH 5,0		pH 7,8	
	Absorption bei 230 nm	Absorption bei 550 nm	Absorption bei 230 nm	Absorption bei 550 nm
ungepuffert				
Citrat-Phosphat ¹⁾	0,04	0,04	0,79	0,83
0,05 M	0,04	0,03	0,10	0,14
0,1 M	0,02	0,03	0,02	0,01
Phosphat ²⁾				
0,05 M	0,02	0,02	0,05	0,08
0,1 M	0,00	0,00	0,00	0,00
Tris/HCl				
0,05 M	-	-	0,79	0,86
0,1 M	-	-	0,76	0,80
0,2 M	-	-	0,64	0,72

1) nach McILVAINE

2) nach SÖRENSEN

Nach Abklärung dieser methodischen Voraussetzungen wurde dann das pH-Optimum für die transeliminative Pektinspaltung bei pH 8,0 (Abb. 26) festgestellt.

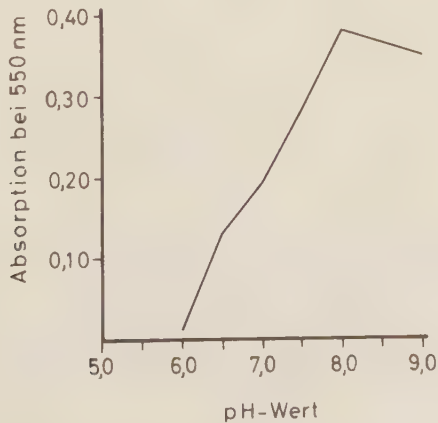


Abb. 26: PTE-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Unterhalb von pH 6,0 entwickelte die Transeliminase keine, bei pH 6,0 selbst nur eine geringe Aktivität. Eine pH-Erhöhung auf 7,0 führte zu einer starken Steigerung, die bis zum Optimum bei pH 8,0 unvermindert anhielt. Höhere pH-Werte bedingten einen leichten Aktivitätsrückgang. Transeliminative Spaltungen der Pektatketten konnten im geprüften pH-Bereich nur in geringem Ausmaße nachgewiesen werden.

b) Aktivitätsbeeinflussung durch zweiwertige Kationen Da bekannt ist, daß die PTE-Aktivität durch Ca^{++} -Ionen gefördert werden kann (STARR und MORAN 1962, EDSTROM und PHAFF 1964, BATEMAN 1966), sollte der Einfluß verschiedener CaCl_2 -Konzentrationen auf die Aktivität getestet werden (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluß verschiedener CaCl_2 -Konzentrationen auf die PTE-Aktivität

	230 nm	Absorption bei		
		RZ	550 nm	RZ
ohne CaCl_2	0,29	100	0,26	100
0,0001 M CaCl_2	0,34	117	0,30	115
0,0005 M CaCl_2	0,37	128	0,38	146
0,001 M CaCl_2	0,44	152	0,39	150
0,002 M CaCl_2	0,41	141	0,35	135
0,003 M CaCl_2	0,36	124	0,32	123

Dabei stellte sich heraus, daß die vorhandene Transeliminase durch Ca^{++} -Ionen stimuliert wurde, wobei man die beste Wirkung mit einer 0,001 M Konzentration erzielte. In Anwesenheit von 0,001 M CaCl_2 konnte schon nach einer Reaktionszeit von 30 Min. eine transeliminative Pektinspaltung nachgewiesen werden, während sie in Reaktionsgemischen ohne Ca^{++} -Zusatz erst nach 90 Min. erfaßbar war (Abb. 27). Der fördernde Einfluß der Ca-Ionen blieb über die gesamte Versuchsdauer von 2 Std. erhalten.

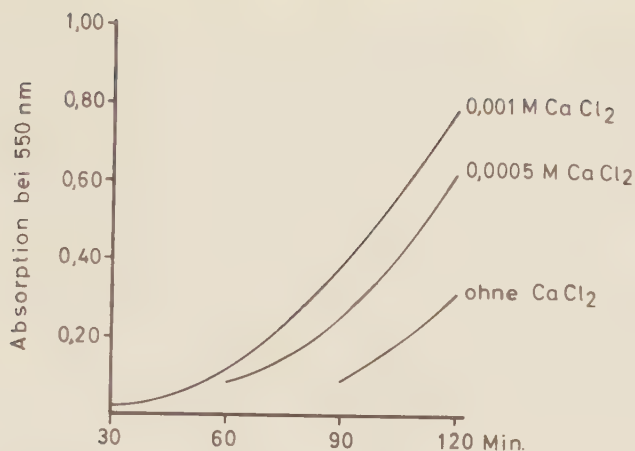


Abb. 27: Auswirkung von CaCl_2 auf die PTE-Aktivität

EDSTROM und PHAFF (1964) wie auch MacMILLAN und VAUGHN (1964) fanden, daß außer Ca^{++} weitere Kationen die Transeliminase-Aktivität zu fördern vermögen. Wir bezogen deshalb Mg^{++} , Mn^{++} , Ba^{++} und Sr^{++} mit einer Konzentration von 0,001 M in unsere Untersuchungen ein (Tab. 9).

Tab. 9: Einfluß verschiedener zweiwertiger Ionen (0,001 M) auf die PTE-Aktivität

	Absorption bei			
	230 nm	RZ	550 nm	RZ
0	0,47	100	0,48	100
CaCl_2	0,84	179	0,73	152
MgCl_2	0,77	164	0,55	115
MnCl_2	0,46	98	0,36	75
BaCl_2	0,33	70	0,44	92
SrCl_2	0,76	162	0,50	104

Außer Ca^{++} wirkten sich von den untersuchten Ionen noch Mg^{++} und Sr^{++} aktivitätsfördernd aus, wenn auch in geringerem Maße. Diese Ergebnisse wurden viskosimetrisch bei pH 8,0 überprüft. Die mit diesem Verfahren gewonnenen Resultate stimmen mit den spektralphotometrisch gefundenen überein. Auch hier wurde durch Ca^{++} die weitaus

stärkste Förderung erzielt. Eine geringere Steigerung der PTE-Aktivität konnte mit Mg^{++} und Sr^{++} erreicht werden, während Mn^{++} hemmend auf den transeliminativen Pektinabbau wirkte. Der Einfluß von $BaCl_2$ konnte nicht viskosimetrisch überprüft werden, da diese Substanz in 0,001 M Konzentration eine Gelierung der Pektinlösung bedingte.

c) Temperaturstabilität

Die Aktivität der Pektinmethyl-Transeliminase wurde durch das Einwirken von Temperaturen über $30^{\circ}C$ beträchtlich vermindert (Tab. 10).

Tab. 10: Temperatur-Stabilität der PTE

Temperatur	Absorption bei			
	230 nm	RZ	550 nm	RZ
$20^{\circ}C$	0,48	100	0,66	100
$25^{\circ}C$	0,47	100	0,67	100
$30^{\circ}C$	0,48	100	0,66	100
$35^{\circ}C$	0,43	90	0,60	91
$40^{\circ}C$	0,29	60	0,44	67
$45^{\circ}C$	0,19	40	0,24	37
$50^{\circ}C$	0,02	4	0,07	10
$55^{\circ}C$	0,01	2	0,05	7
$60^{\circ}C$	0,00	0	0,00	0

Die Temperaturstabilität dieses Enzyms war so gering, daß schon der Aufenthalt des Kulturfiltrates für 30 Min. bei $35^{\circ}C$ zu einer Aktivitätsminderung führte. Nach Einwirkung von $50^{\circ}C$ verblieb nur eine geringe Restaktivität. Mit $60^{\circ}C$ wurde jegliche Aktivität beseitigt.

d) pH-Stabilität

Die Auswirkung extremer pH-Werte auf die PTE-Aktivität zeigt Tab. 11.

Tab. 11: pH-Stabilität der PTE

pH-Wert	Absorption bei 550 nm	RZ
1,0	0,04	12
3,0	0,14	41
4,5	0,30	88
6,0	0,34	100
9,0	0,33	100
12,0	0,18	53

Durch den 14-stündigen Aufenthalt des Kulturfiltrats bei niederen pH-Werten wurde das Enzym am empfindlichsten geschädigt. Im Gegensatz zur Aktivität der Polygelsäkeuronasen wurde die Transeliminase-Aktivität auch bei einem pH-Wert von 3,0 erheblich reduziert, während bei pH 12,0 die Transeliminase mit einem geringeren Aktivitätsverlust als die Polygelsäkeuronase reagierte.

5.3. Pektinmethylesterase (PME)

In den Kulturfiltraten von C. herpotrichoides konnte auch eine Pektinmethylesterase nachgewiesen werden. Zunächst wurde der Einfluß verschiedener C-Quellen und der des pH-Wertes der Nährlösung auf die PME-Produktion untersucht.

5.3.1. Beeinflussung der PME-Produktion

a) Einfluß verschiedener C-Quellen

Es kam uns in erster Linie darauf an, die Bedeutung des Pektins für die Synthese der Pektinmethylesterase herauszufinden. Deshalb wurde Pektin sowohl allein als auch in Kombination mit anderen C-Quellen (jeweils zu 0,5%) als Nährstoff angeboten. Abb.28 läßt deutlich den fördernden Einfluß, den Pektin auf die PME-Produktion ausübte, erkennen.

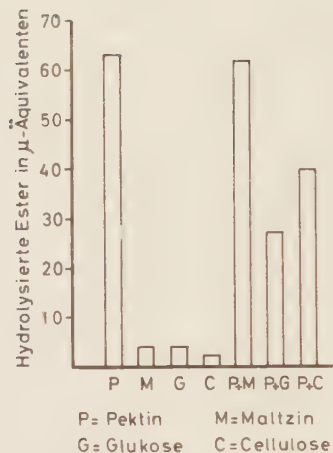


Abb. 28: Einfluß verschiedener C-Quellen auf die PME-Aktivität der Kulturfiltrate

Alle Nährlösungen, die Pektin als Komponente enthielten, zeichneten sich durch eine gute PME-Ausbeute aus. Lediglich die Kombination Pektin-Glukose fiel dabei etwas ab. Maltzin, Glukose und Cellulose als alleinige C-Quellen erbrachten nur geringe Aktivitäten.

b) pH-Einfluß

Die höchste PME-Aktivität war dann zu verzeichnen, wenn die Nährlösung bei pH 5,4 gepuffert wurde (Abb. 29).

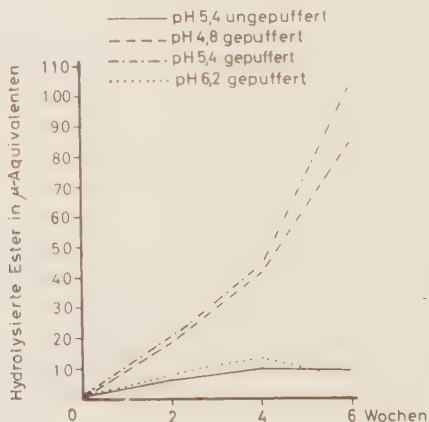


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der PME-Aktivität der Kulturfiltrate in Abhängigkeit vom pH-Wert der Nährlösung

Nach 2 Wochen war zwischen den Kulturfiltraten der Nährlösungen von pH 4,8 und pH 5,4 noch kein Aktivitätsunterschied aufgetreten. Nach zwei weiteren Wochen zeichnete sich bereits die Überlegenheit des höheren pH-Wertes schwach und nach insgesamt 6 Wochen Kulturdauer deutlich ab. Das ungepufferte sowie das auf pH 6,2 eingestellte Nährmedium lieferten über den ganzen Untersuchungszeitraum hinweg nur eine geringe Enzymausbeute.

c) Abhängigkeit vom Kulturalter

Nach einer 2-wöchigen Bebrütungsdauer lag unter den gegebenen Bedingungen eine beträchtliche Aktivität vor, die sich nach 6 Wochen nahezu verdoppelte und nach 8 Wochen ihren Höhepunkt erreichte (Abb.30).

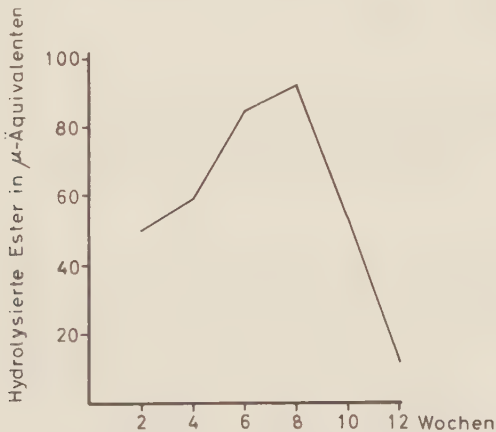


Abb.30: PME-Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Mit einer Verlängerung der Kulturdauer um weitere 4 Wochen war ein steiler Abfall der PME-Aktivität verbunden. In Gegensatz zu den Enzymen vom Typ der Polygalakturonasen schien die PME weniger stabil zu sein.

5.3.2. Beeinflussung der PME-Aktivität

a) Einfluß des pH-Wertes

Abb. 31 gibt die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wieder. Es zeigte sich, daß bei pH 3,0 nur eine

schwache Aktivität vorlag. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 4.0 hatte einen steilen Anstieg der Aktivitätskurve zur Folge. Mit einer weiteren pH-Erhöhung war ein stetiger Aktivitätsanstieg zu verzeichnen. Die Aktivität betrug beim Optimum (pH 7,5) etwa das 8-fache der bei pH 3.0 ermittelten. Jenseits des Optimums fiel die Aktivität drastisch ab.

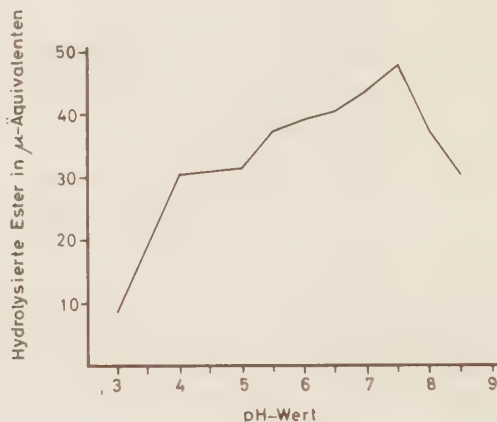


Abb. 31: Abhängigkeit der PME-Aktivität vom pH-Wert

b) Aktivitätsbeeinflussung durch Natriumchlorid

Durch Zusatz von Natriumchlorid konnte die PME-Aktivität beträchtlich gesteigert werden (Abb. 32). NaCl in einer Konzentration von 0,085 M erbrachte eine mehr als dreimal höhere Aktivität als NaCl-freie Lösungen. Aber schon bei 0.1 M NaCl zeichnete sich Aktivitätsminderung ab, die sich bei einer weiteren Konzentrationserhöhung stärker auswirkte. Dennoch war die PME-Aktivität bei einer NaCl-Konzentration von 0,5 M wesentlich größer als in den vergleichbaren Proben ohne Natriumchloridzusatz.

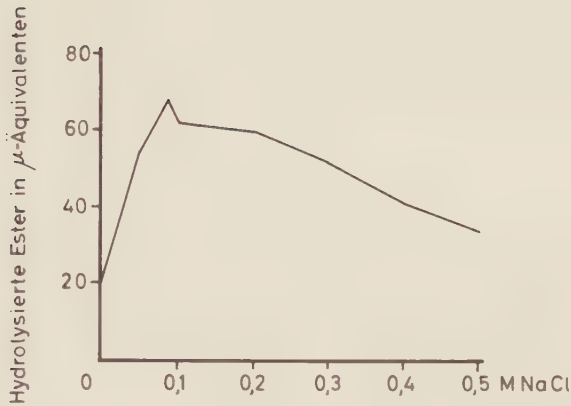


Abb. 32: Einfluß der NaCl-Konzentration auf die PME-Aktivität

c) Temperaturstabilität

Die Pektinmethylesterase reagierte in ähnlicher Weise wie die zuvor beschriebenen pektolytischen Enzyme (Abb.33).

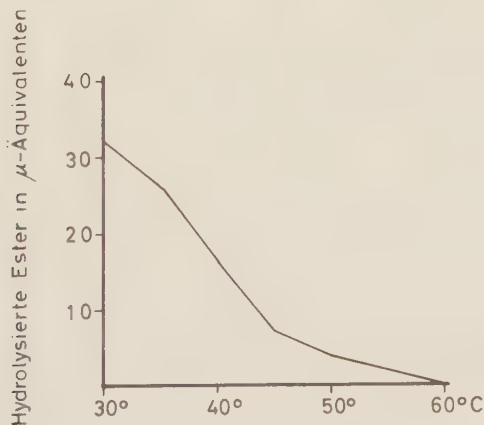


Abb. 33: Temperaturstabilität der PME

Schon bei einer Temperaturerhöhung von 30° auf 35° fiel die Aktivität deutlich ab und die Exposition der Enzymlösung für 30 Min. bei 40° verminderte die Aktivität

auf die Hälfte. Bei 60°C war das Enzym völlig inaktiviert.

d) pH-Stabilität

Extreme pH-Werte beeinflussen die PME-Aktivität nur unterhalb pH 3 und oberhalb pH 9 (Abb. 34).

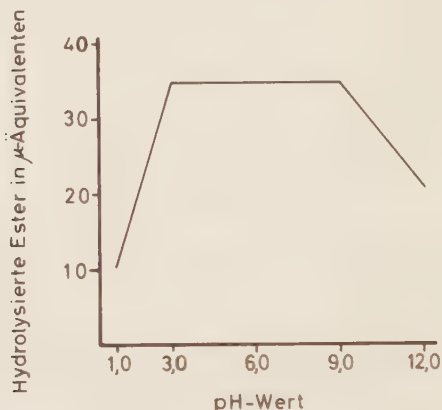


Abb. 34: pH-Stabilität der PME

Im sauren Bereich war die Schädigung stärker. pH 1 reduzierte die Wirksamkeit des Enzyms auf weniger als 1/3, aber auch bei pH 12 trat ein deutlicher Aktivitätsabfall auf.

5.4. Chromatographischer Nachweis von Pektin- bzw. Pektatabbauprodukten

Für die Einordnung der Polygalakturonasen und der Transeliminassen in das von BATEMAN und MILLAR (1966) vorgeschlagene Schema war es bedeutungsvoll zu wissen, ob es sich im vorliegenden Fall um Enzyme des endo- oder exo-Typs handelte. Bei Enzymen des exo-Typs, die endständige Galakturonsäureglieder abspalten, muß schon nach kurzer Reaktionszeit Monogalakturonsäure in den Reaktionsgemischen auftreten.

Zur Überprüfung wurden Enzymlösungen mit Pektin und Pektat bei den für die einzelnen Enzyme optimalen pH-Werten (pH 4,5 - 5,0 für die Polygalakturonasen, pH 8,0 für die Transeliminassen) inkubiert. Aber selbst nach 48 Stunden

konnte mit beiden verwendeten Verfahren keine Monogalakturonsäure nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sowie der verhältnismäßig starke Viskositätsverlust der Pektin- bzw. Pektatlösungen führten zu dem Schluß, daß es sich um Enzyme des endo-Typs handeln muß.

6. Cellulolytische Enzyme

6.1. C_x -Aktivität

Wie schon erwähnt, konnte in Kulturfiltraten von C. herpo-trichoides auch eine C_x -Aktivität nachgewiesen werden. Ob sich die erfaßte C_x -Cellulase aus mehreren Komponenten zusammensetzt, wie es für Cellulasen anderer Herkunft oft beschrieben worden ist (z.B. GILLIGAN und REESE 1954, MILLER und BLUM 1956, HASH und KING 1958, MILLER et al. 1960, PETTERSSON et al. 1963, PETTERSSON und PORATH 1963, ERIKSSON und PETTERSSON 1968, ERIKSSON und RZEDOWSKI 1969, WHITNEY et al. 1969) wurde nicht näher untersucht.

Cellulolytische Enzyme werden als induzierbare Enzyme angesehen, wobei Cellulose und ihre wasserlöslichen, kurzket-tigen Depolymerisationsprodukte als Induktoren fungieren (MANDELS und REESE 1960, LYR und SCHANÉL 1964). Andere Verbindungen mit β -glykosidischen Bindungen können ebenfalls wirksam sein (NORKRANS 1967). In einigen Fällen ist aber eine Cellulaseproduktion auch in Abwesenheit von Cellulose nachgewiesen worden (HAMMERSTRÖM et al. 1955, LYR 1959, HULME und STRANKS 1970). Hemmend auf die Enzymbildung können Glukose und Cellobiose in höheren Konzentrationen wirken (HUSAIN und DIMOND 1960, HORTON und KEEN 1964, HORTON und KEEN 1966).

Da schon in früheren Abschnitten der Einfluß verschiedener C-Quellen und anderer Kulturbedingungen auf die C_x -Produktion sowie die Auswirkungen aktivitätsbeeinflussender Faktoren aufgezeigt wurden, können sich die folgenden Erörterungen auf die Eigenschaften der C_x -Cellulase beschränken.

Die cellulolytische Aktivität war wesentlich geringer als die pektolytische Aktivität, wie sich bei einem Vergleich der relativen Aktivitäten ersehen läßt (vgl. Abb. 9).

Da unter ungünstigen Bedingungen ein 50 %iger Viskositäts-

verlust der CMC-Lösung oft gar nicht oder nur nach sehr langen Reaktionszeiten zu erreichen war, wurde so verfahren, daß die Messung dieser Proben zu dem Zeitpunkt abgebrochen wurde, bei dem die unter günstigsten Versuchsbedingungen verlaufende Reaktion eine 50 %ige Reduzierung der Ausgangsviskosität herbeigeführt hatte. Korrekter wäre es gewesen, in allen Varianten den Zeitpunkt des 50 %igen Viskositätsverlustes abzuwarten, was sich aber wegen der geringen cellulolytischen Aktivität als nicht praktikabel erwies.

6.1.1. Beeinflussung der Enzymaktivität

a) Einfluß des pH-Wertes

Bei der Ermittlung des pH-Optimums der vorliegenden C_x -Cellulase war mit einer ähnlichen Viskositätsveränderung des Substrats durch den pH-Wert zu rechnen, wie sie schon bei der viskosimetrischen Pektinase-Bestimmung beschrieben worden ist. Wie Abb. 35 zeigt, trat eine besichtliche Viskositätsbeeinflussung der als Substrat verwendeten 0,8 %igen CMC-Lösung durch den pH-Wert auf.

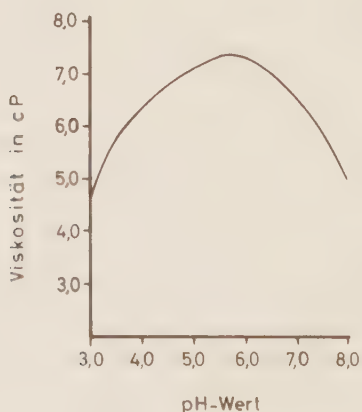


Abb. 35: Abhängigkeit der Viskosität einer 0,8 %igen CMC-Lösung vom pH-Wert

Bei pH 6,0 war die Viskosität der Lösung am größten. Mit steigender H-Ionenkonzentration nahm sie rasch ab, wobei der stärkste Viskositätsabfall bei der Erniedrigung des

pH-Wertes von 4,0 auf 3,0 zu verzeichnen war. Die Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich führte ebenfalls zu einer Viskositätsabnahme. Die Viskosität bewegte sich in diesem Versuch zwischen 7,3cP bei pH 6,0 und 4,4cP bei pH 3,0.

Das pH-Optimum der C_x -Cellulase von C. herpotrichoides lag im pH-Bereich von 5,5 - 6,5 und entsprach damit dem Optimum pilzlicher Cellulasen anderen Ursprungs. Abb.36 zeigt den Zusammenhang zwischen pH-Wert und Aktivität des Enzyms auf. Diese Cellulase entwickelte in einem breiten pH-Bereich ihre optimale Wirkung, ließ jedoch bei einer weiteren Veränderung des pH-Wertes nach oben bzw. nach unten in ihrer Aktivität stark nach. Bei pH 8,0 betrug der Abbau nur noch etwa 50% des unter optimalen pH-Bedingungen ermittelten Wertes, während bei pH 3,0 lediglich eine geringe Substratumsetzung ablief.

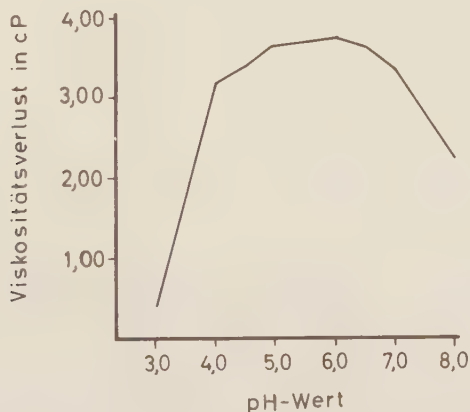


Abb. 36: pH-Optimum der C_x -Cellulase (Viskositätsverlust einer 0,8%igen CMC-Lösung während 30 Min. bei 30°C)

Reduzierende Gruppen waren erst nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden in geringem Ausmaße erfaßbar. Auch mit dieser Methode konnte im pH-Bereich um 6,0 eine verstärkte Spaltung der Glykosidbindungen nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß erst nach 10-stündiger Inkubationszeit reduzierende Gruppen in den Reaktionsgemischen

nachweisbar waren, die Viskosität jedoch schon nach 60 Min. stark vermindert war, läßt den Schluß zu, daß Spaltungen innerhalb der Substratketten stattgefunden haben.

b) Temperaturstabilität

Die bisher untersuchten C_x -Cellulasen mikrobiellen Ursprungs erwiesen sich als relativ hitzestabil (REESE und MANDELS 1963). Auch die C_x -Cellulase von C. herpotrichoides reagierte auf hohe Temperaturen weniger empfindlich als die zuvor beschriebenen pektolytischen Enzyme. Während die pektolytische Aktivität der Kulturfiltrate schon durch Temperaturen von 40°C beträchtlich vermindert wurde, blieb die cellulolytische Aktivität bei dieser Temperatur noch unbeeinflusst (Abb. 37).

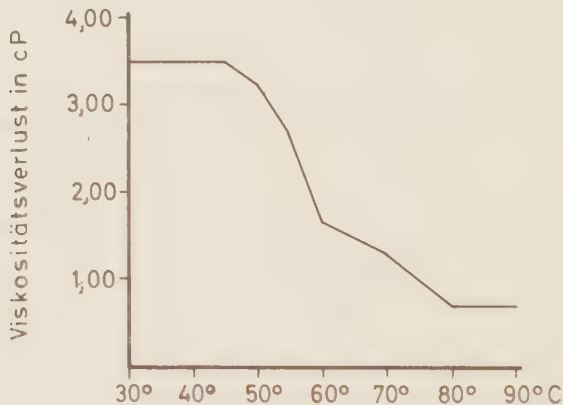


Abb. 37: Temperaturstabilität der C_x -Cellulase (Viskositätsverlust einer 0,8 %igen CMC-Lösung während 30 Min. bei pH 6,0 und 30°C)

Erst Temperaturen über 45°C führten nach 30-minütiger Einwirkungszeit zu Schädigungen, aber selbst nach dem Erhitzen auf 60°C war die Aktivität des Enzyms - gemessen am Viskositätsverlust einer CMC-Lösung - nur etwa um 50 % geringer als bei 30-40°C. Temperaturerhöhungen über 60°C hinaus verringerten die Aktivität ständig, wenn auch bei 90°C noch immer eine gewisse Restaktivität vorlag.

c) pH-Stabilität

Die vorliegende C_x -Cellulase reagierte auf extreme pH-Werte ähnlich wie Cellulasen anderer Organismen (vgl. HALLIWELL 1963, MANDELS und REESE 1963 sowie PETTERSSON und ANDERSSON 1968). Aus Abb. 38 geht hervor, daß dieses Enzym im pH-Bereich zwischen 4,0 und 8,0 stabil war und daß im alkalischen Bereich eine stärkere Enzymschädigung als im sauren Milieu vonstattenging.

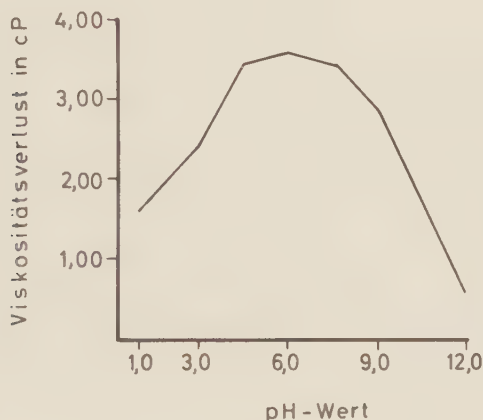


Abb. 38: pH-Stabilität der C_x -Cellulase (Viskositätsverlust einer 0,8 %igen CMC-Lösung während 30 Min. bei pH 6,0 und 30°C)

6.2. C_1 -Aktivität

Organismen, die Cellulasen des C_x -Typs produzieren, sind lediglich zum Abbau modifizierter Cellulose befähigt, können jedoch keine native Cellulose angreifen. Für diesen Prozeß bedarf es der Mitwirkung eines weiteren Enzyms, der C_1 -Cellulase. Nur Mikroorganismen, die sowohl das C_1 - als auch das C_x -Enzym zu bilden vermögen, sind im Sinne von REESE et al. (1950) als "echte Cellulosezerersetzer" zu bezeichnen. Da C. herpotrichoides es beim Angriff auf den Getreidehalm mit nativer Cellulose zu tun hat, ist die Beantwortung der Frage von Interesse, ob der Pilz in der Lage ist, neben dem beschriebenen C_x -Enzym auch die C_1 -Komponente zu bilden.

6.2.1. C₁-Aktivität in Gegenwart des Pilzes

In einer Reihe von Vorversuchen, deren Ergebnisse hier nur summarisch wiedergegeben werden, war zunächst getestet worden, ob der Pilz native Cellulose in Form von Linterspulver (Schleicher & Schüll) und Filtrierpapier (Schleicher & Schüll 595a) als C-Quelle verwertete.

Dabei hatte sich ergeben, daß C. herpotrichoides auf einem Nährboden der üblichen Art, der als alleinige C-Quelle Linterspulver (1 %ig, 0,5 %ig sowie 0,25 %ig) in gleichmäßiger Verteilung enthielt, zu wachsen vermochte. Eine Aufhellung des Nährsubstrates - eine Hof-Bildung am Kolonienrand - konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Fähigkeit des Pilzes auf Filtrierpapier, das mit der üblichen Nährlösung, jedoch ohne C-Quelle getränkt war, zu wachsen und die Tatsache, daß sich bewachsene Papierteile dünner als unbewachsene erwiesen, deuteten auf eine C₁-Aktivität hin.

In einem Versuch, der sich über 8 Wochen erstreckte, sollte die C₁-Wirkung anhand des Gewichtsverlustes von mit dem Pilz in Nährlösung (75 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben) inkubierten Filtrierpapierstreifen (durchschnittliches Gewicht 250 mg) ermittelt werden. Nach einer 6-wöchigen Bewachung hatte sich das Myzel soweit entwickelt, daß es mit den Papierstreifen am Kolbengrund in Berührung kam.

Es erwies sich als nicht durchführbar, die Myzelteile ohne Beschädigung des Filtrierpapiers von diesem zu trennen; außerdem war eine vollständige Ablösung des Pilzmyzels nicht in allen Fällen möglich. Die Aussagekraft der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse war deshalb von vornherein begrenzt. Es konnte zwar nach einer Inkubationszeit von 6 Wochen ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von 7 % und nach 8 Wochen von 10 % errechnet werden, doch waren die einzelnen Werte wegen der angeführten Gründe großen Schwankungen unterworfen. Eindeutige Aussagen über die C₁-Wirkung sowie die Beantwortung der Frage, ob ein Kontakt zwischen Pilz und Substrat für dessen Abbau erforderlich ist, ließen sich auf der Grundlage dieses Versuches nicht machen.

Die Wirkung des C₁-Enzyms wurde in den folgenden Versuchen durch den Verlust der Reißfestigkeit von Baumwollfäden be-

stimmt. Nährlösungen der üblichen Zusammensetzung wurden zu 25ml in 100ml Erlenmeyerkolben eingefüllt, mit einem Faden beschickt, nach dem Sterilisieren beimpft und bis zu 8 Wochen bei Zimmertemperatur bebrütet. Als Impfmateriel diente ein Myzelstück von Stamm 194 bzw. 98/2. Eine Nährlösung, die Glukose (1%) als C-Quelle enthielt, wurde mit in den Versuch einbezogen. Zur Ermittlung der Reißfestigkeitsverluste diente der in Abb.1 dargestellte Garnfestigkeitsprüfer.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab.12 zusammengestellt. Von den beiden getesteten Stämmen erwies sich Stamm 98/2 als der aktivere; er führte in allen Fällen eine stärkere Schädigung der Baumwollfäden herbei. Dabei war die Zusammensetzung der Nährlösung nicht unwesentlich. So wurden die Fäden in der glukosehaltigen Nährlösung weniger stark angegriffen und hielten somit höheren Zugbelastungen stand als solche Fäden, die mit dem Pilz in der Standardnährlösung inkubiert waren.

Die Myzelgewichte der beiden Varianten wichen nur unwesentlich voneinander ab, während in der Nährlösung mit Glukose die C_x -Aktivität geringfügig höher war als in der Standardlösung.

Beim Vergleich der Reißfestigkeitsverluste der beiden geprüften Baumwollfäden zeigte sich, daß das Garn (Nm 34/1) durch die in dem flüssigen Nährmedium vorliegende C_1 -Cellulase stärker als der Zwirn (Nm 116/2) geschädigt wurde. Die Reißfestigkeit der unbeimpften Kontrollfäden änderte sich während der Versuchsdauer nicht.

In einer weiteren Versuchsserie sollte überprüft werden, ob ein direkter Kontakt des Pilzes mit dem Baumwollfaden einen stärkeren Abbau gewährleistete. Jeder Kolben - mit 75ml der üblichen Nährlösung - enthielt 6 Fäden (Nm 116/2), von denen 3 am Kolbengrund lagen, während die restlichen 3 so angebracht waren, daß sie vom sich entwickelnden Pilz besiedelt werden konnten (Abb.39). Durch die gewählte Versuchsanstellung wurde erreicht, daß aus einem Kolben Fäden zur Verfügung standen, die mit dem Pilzmyzel bzw. nur mit der Nährlösung in Berührung gekommen waren. Dabei war jedoch zu berücksichtigen, daß erst mit der Bildung der Myzeldecke ein Kontakt zwischen Fäden und Pilz eintritt.

Tab. 12: Veränderung der Reißfestigkeit (in g) zweier Baumwollfäden (Nm 34/1 und 116/2) in beimpften Nährlösungen in Abhängigkeit von der Zeit bei Verwendung verschiedener C-Quellen.
Reißfestigkeit der unbeimpften Kontrollen (in g):

34/1: $432 \pm 32,7$
(100)

116/2: $1070 \pm 24,5$
(100)

Zeit	Pektin (0,5%) Stamm 194		+ Maltzin (0,5%) Stamm 98/2		Glukose(1 %) Stamm 98/2	
	34/1	116/2	34/1	116/2	34/1	116/2
2 Wochen	$280 \pm 67,3$ (65)	$986 \pm 35,8$ (92)	$232 \pm 12,4$ (54)	$840 \pm 18,7$ (79)	$298 \pm 31,2$ (69)	$994 \pm 30,5$ (93)
4 Wochen	$183 \pm 20,3$ (42)	$678 \pm 68,7$ (63)	$158 \pm 12,5$ (37)	$590 \pm 15,8$ (55)	$227 \pm 15,1$ (53)	$772 \pm 47,6$ (72)
6 Wochen	$116 \pm 16,5$ (27)	$416 \pm 87,3$ (39)	$84 \pm 8,1$ (19)	$374 \pm 16,9$ (35)	$180 \pm 24,1$ (42)	$670 \pm 44,7$ (63)
8 Wochen	$78 \pm 20,2$ (18)	$378 \pm 35,6$ (35)	$48 \pm 9,3$ (11)	$182 \pm 10,5$ (17)	$138 \pm 25,9$ (32)	$540 \pm 35,4$ (50)
					$272 \pm 10,3$ (63)	$866 \pm 26,1$ (81)
					$208 \pm 12,0$ (48)	$670 \pm 21,2$ (63)
					$128 \pm 11,6$ (30)	$572 \pm 6,9$ (53)
					$62 \pm 6,3$ (14)	$330 \pm 13,4$ (31)



Abb. 39: Inkubation von Baumwollfäden zum Nachweis der C_1 -Cellulase

In den meisten Proben kam der Kontakt nach 4 Wochen zustande.

Die Ergebnisse dieses über einen Zeitraum von 8 Wochen laufenden Versuches sind in Tab.13 wiedergegeben.

Die statistische Auswertung mit dem t-Test (nach STUDENT) ergab nach 2 und 4 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Proben. Nach 6 Wochen änderte sich das Bild. Inzwischen hatte sich das Myzel soweit ausgebreitet, daß es die einhängenden Baumwollfäden erfaßte. Die Fäden wiesen an der Kontaktstelle eine dunkelbraune bis schwarze, manchmal auch eine bräunlich-gelbe Färbung auf und zerrissen bevorzugt an diesen Stellen. In den 6 und 8 Wochen alten Kulturen war die Reißfestigkeit der Fäden, die mit dem Pilzmyzel Berührung hatten, stärker vermindert als bei den Fäden, die am Grund des Kulturgefäßes gehalten wurden. Die aufgetretenen Unterschiede erwiesen sich als hochsignifikant.

Tab. 13: Beeinflussung der Reißfestigkeit (in g) eines Baumwollfadens in beimpfter Nährlösung ohne und mit Kontakt mit dem Pilzmyzel.

Reißfestigkeit der unbeimpften Kontrolle: 1070 g

	A ohne Kontakt mit dem Myzel	B mit Kontakt mit dem Myzel	stat. Sicherung ¹⁾ zwischen A u. B
2 Wochen	1005	1002	-
4 Wochen	856	855	-
6 Wochen	650	576	++
8 Wochen	556	431	++

1) -: nicht gesichert

++: hoch signifikant ($p < 0,1 \%$)

Um einen noch innigeren Kontakt zwischen Pilz und Substrat von Versuchsbeginn an herzustellen, wurde bei einer weiteren Versuchsanstellung in einer Petrischale ein Myzelstück direkt auf einen Baumwollfaden (Nm 116/2) geimpft. Die Entwicklung der Reißfestigkeit wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen verfolgt. Abb. 40 zeigt die Entwicklung des Pilzes (Stamm 194) während der 35-tägigen Versuchsdauer.

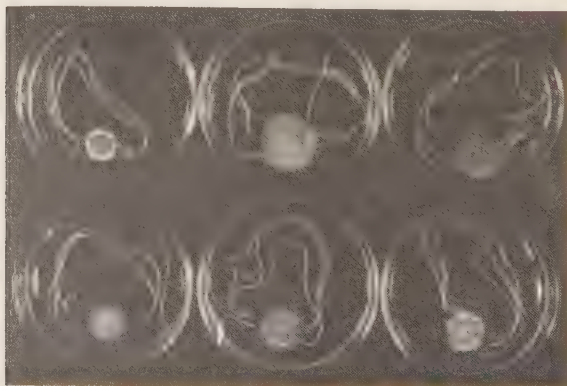


Abb. 40: Bewachung von Baumwollfäden durch C.herpotricho-
ides (Stamm 194; 10-35 Tage)

Die erste Bestimmung wurde nach 10 Tagen, jede weitere im 5-tägigen Abstand vorgenommen. Die Abbauergebnisse der Stämme 194 und 98/2 wurden denen von Trichoderma viride, als aktiver C₁-Produzent bekannt, gegenübergestellt. Neben der Standardnährlösung wurden außerdem solche eingegeben, die Glukose bzw. Linterspulver als C-Quelle enthielten. In Tab. 14 sind die ermittelten Resultate der einzelnen Varianten zusammengestellt.

Es zeigte sich, daß die Baumwollfäden schon nach 10 Tagen geschädigt waren, so daß deren Reißfestigkeit eindeutig vermindert wurde. Mit einer Verlängerung der Inkubationszeit lief eine weitere Schädigung der Fäden einher. Zunächst rissen die Fäden bevorzugt an den Stellen, auf denen sich der Pilz ausgebreitet hatte. Gegen Versuchsende hin war in den aktivsten Varianten kein Unterschied in der Reißfestigkeit bewachsener und unbewachsener Partien festzustellen. Offenbar war die Enzymkonzentration zu diesem Zeitpunkt in der Nährlösung so hoch, daß alle Teile des Fadens entscheidend angegriffen waren.

Stamm 98/2 erbrachte auch in diesem Test bessere Ergebnisse als Stamm 194. Schon nach 20 Tagen bewirkte er in der Standardnährlösung eine Verringerung der Reißfestigkeit um nahezu 70 %, während Stamm 194 lediglich eine Minderung von 25 % erzielte. In der Nährlösung mit Glukose verlief der Abbau in der Anfangsphase beschleunigt. Vom zwanzigsten Tag ab erwies sich die Standardnährlösung bei beiden Stämmen überlegen.

Überraschend gut waren die Ergebnisse der Nährlösung, die außer Linterspulver keine weitere C-Quelle enthielt. Die hier inkubierten Proben zeichneten sich durch stärkste Verluste der Reißfestigkeit aus (Stamm 98/2). T. viride entwickelte in unseren Versuchen im allgemeinen eine stärkere Aktivität als C. herpotrichoides.

Schon nach einer Inkubationszeit von nur 10 Tagen war der Faden in der Standardnährlösung in solch einem Ausmaße angegriffen, daß seine Reißfestigkeit um nahezu 70 % vermin-

Tab. 14: Beeinträchtigung der Reißfestigkeit (in g) von Baumwollfäden durch Pilzbewuchs in verschiedenen Nährlösungen in Abhängigkeit von der Wuchsdauer.
Unempfindliche Kontrolle: Reißfestigkeit $1070 \pm 24,5$ g
(100)

Zeit	Pektin (0,5%) + Maltzin (0,5%)			Glukose (1%)		Linterspolver (1%)			
	C.herpotrichoides 194	98/2	Tricho- derma viride	C.herpotrichoides 194	98/2	Tricho- derma viride	C.herpotrichoides 194	98/2	Tricho- derma viride
10 Tg.	958 $\pm$ 22,8 (90)	888 $\pm$ 39,0 (83)	353 $\pm$ 10,8 (33)	936 $\pm$ 16,7 (87)	848 $\pm$ 27,7 (79)	618 $\pm$ 50,2 (58)	986 $\pm$ 15,2 (92)	766 $\pm$ 59,7 (72)	446 $\pm$ 31,3 (42)
15 Tg.	916 $\pm$ 21,9 (86)	828 $\pm$ 30,3 (77)	185 $\pm$ 30,7 (17)	866 $\pm$ 49,8 (81)	700 $\pm$ 37,4 (65)	328 $\pm$ 24,6 (31)	960 $\pm$ 40,6 (90)	446 $\pm$ 29,7 (42)	165 $\pm$ 5,4 (15)
20 Tg.	796 $\pm$ 34,4 (74)	330 $\pm$ 23,5 (31)	160 $\pm$ 12,1 (15)	842 $\pm$ 33,5 (79)	584 $\pm$ 80,8 (55)	285 $\pm$ 45,4 (27)	938 $\pm$ 23,9 (88)	198 $\pm$ 28,6 (19)	144 $\pm$ 10,3 (13)
25 Tg.	710 $\pm$ 61,6 (66)	52 $\pm$ 3,0 (5)	80 $\pm$ 5,5 (7)	812 $\pm$ 46,0 (76)	222 $\pm$ 74,8 (21)	115 $\pm$ 20,5 (11)	794 $\pm$ 58,1 (74)	34 $\pm$ 6,8 (3)	82 $\pm$ 10,4 (8)
30 Tg.	546 $\pm$ 26,1 (51)	28 $\pm$ 2,8 (3)	41 $\pm$ 6,9 (4)	724 $\pm$ 19,5 (68)	59 $\pm$ 7,0 (6)	114 $\pm$ 8,9 (11)	824 $\pm$ 37,8 (77)	16 $\pm$ 2,6 (1)	19 $\pm$ 4,1 (2)
35 Tg.	309 $\pm$ 26,2 (29)	14 $\pm$ 2,6 (1)	22 $\pm$ 1,7 (2)	618 $\pm$ 70,1 (58)	22 $\pm$ 5,0 (2)	81 $\pm$ 7,9 (8)	772 $\pm$ 65,7 (72)	10 $\pm$ 0 (1)	-

dert war. Übereinstimmend mit den bei C.herpotrichoides erzielten Ergebnissen war die Abbauleistung von T.viride in dem glukosehaltigen Substrat geringer als in den beiden anderen Nährlösungen.

Als Ergebnis dieser Versuche läßt sich festhalten, daß die Wirkung der C_1 -Cellulase sich bei einem direkten Kontakt zwischen Substrat und Pilz verstärkte, daß sie jedoch nicht an diese Berührung gebunden war.

6.2.2. C_1 -Aktivität zellfreier Kulturfiltrate

Kulturfiltrate von C.herpotrichoides, die über ein Bakterienfilter zellfrei filtriert wurden, prüften wir auf ihre Fähigkeit, native Cellulose in Form von Baumwollfäden anzugreifen.

Als Maßstab für die C_1 -Aktivität diente wiederum der Verlust an Reißfestigkeit der in den Kulturfiltraten gelagerten Fäden, der in 2-wöchigen Abständen bestimmt wurde.

Für den vorliegenden Versuch, der sich über 8 Wochen erstreckte, verwendeten wir 6 Wochen alte Kulturfiltrate der Stämme 98/2 und 194. Baumwollfäden, die während der 6-wöchigen Wachstumsphase des Pilzes am Kolbengrund gehalten wurden, waren in ihrer Festigkeit angegriffen. Damit war sichergestellt, daß die für die weitere Untersuchung vorgesehenen Filtrate eine C_1 -Aktivität entwickelt hatten. Abb. 41 gibt die Wirkung zellfreier Kulturfiltrate, ausgedrückt im prozentualen Reißfestigkeitsverlust der Baumwollfäden, in Abhängigkeit von der Zeit wieder.

Aus den Untersuchungen ging hervor, daß zellfreie Kulturfiltrate von C.herpotrichoides eine C_1 -Aktivität entwickelten. In den ersten Wochen konnte keine Abnahme der Reißfestigkeit der Baumwollfäden ermittelt werden.

Nach 4 Wochen war durch Stamm 98/2 ein geringer Reißfestigkeitsverlust ausgelöst worden. Die Unterschiede gegenüber der Kontrolle waren signifikant. Nach 6 und 8 Wochen hatten die Filtrate beider Stämme eine statistisch gesicherte Verminderung der Reißfestigkeit herbeigeführt. Von den beiden Stämmen zeichnete sich Stamm 98/2 erneut durch die höhere Aktivität aus.

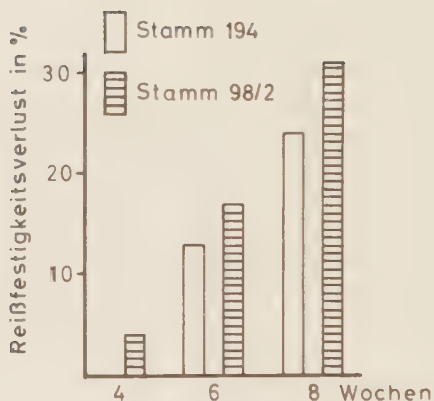


Abb. 41: C₁-Aktivität zellfreier Kulturfiltrate zweier Stämme von C. herpotrichoides

7. Mazerierende Fähigkeiten der Kulturfiltrate

Da die Pektinstoffe die wichtigste Komponente der pflanzlichen Mittellamelle, die benachbarte Zellen miteinander verkittet, darstellen, führt ein Abbau des Pektins in situ zum Zerfall (Mazeration) der Gewebestruktur.

Die von C. herpotrichoides befallenen Halmpartien sind durch eine Gewebeerstörung gekennzeichnet. Es kann deshalb angenommen werden, daß Enzyme mit mazerierenden Eigenschaften für die Pathogenese der Halmschürfwunden von Bedeutung sind.

Kulturfiltrate des Pilzes wurden daraufhin auf die Fähigkeit, Pflanzengewebe zu mazerieren, untersucht.

Die Mazerationsversuche wurden mit undialysierten und dialysierten Kulturfiltraten bei den pH-Werten 4,5; 6,0 und 8,0 durchgeführt. Dabei zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten der beiden Kulturfiltrate (Tab. 15). Während die undialysierte Probe bei pH 4,5 ihre höchste Aktivität entwickelte und nach 2 Stunden einen vollständigen Zerfall von Gurkenscheibchen herbeiführte, vermochte das dialysierte Kulturfiltrat unter den gleichen Bedingungen nur eine schwache Mazeration auszulösen. Gerade umgekehrt war die Wirkung

bei pH 8,0. Die dialysierte Probe entwickelte hier ihre größte Aktivität; bereits nach 1 Stunde war eine totale Mazeration des Gurkengewebes festzustellen. Undialysiertes Kulturfiltrat war bei diesem pH-Wert zu keiner Mazerierung befähigt.

Bei pH 6,0 konnte im Gegensatz zu pH 4,5 und 8,0 mit beiden Filtraten ein Zerfall der Gurkenscheibchen beobachtet werden.

Der Zusatz von CaCl_2 (0,001 M) zu dialysiertem Kulturfiltrat führte eine geringe Beschleunigung des Mazerationsprozesses bei pH 8,0 herbei.

Tab. 15: Mazerierende Wirkung dialysierter und undialysierter Kulturfiltrate von C. herpotrichoides bei verschiedenen pH-Werten

	pH 4,5		pH 6,0		pH 8,0	
	dialy- siert	undialy- siert	dialy- siert	undialy- siert	dialy- siert	undialy- siert
30 Min.	0	+	(+)	(+)	++(+)	0
60 Min.	0	++	+	++	+++	0
120 Min.	+	+++	+(+)	++(+)	+++	0

Die in Tab. 15 zusammengestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß mehrere Enzymkomponenten an dem Mazerationsprozeß beteiligt sind. Enzymproben aus Kulturfiltraten, in denen dem Pilz als C-Quelle lediglich Maltzin angeboten wurde und die nur eine schwache pektolytische, jedoch deutlich nachweisbare cellulolytische Aktivität aufwiesen, besaßen bei den drei geprüften pH-Werten nur eine geringe mazerierende Wirkung. Das gleiche gilt für Kulturfiltrate, die 30 Min. bei 50°C gehalten wurden und dabei ihre pektolytische Aktivität weit mehr als ihre cellulolytische Wirksamkeit eingebüßt hatten.

In hitzeinaktivierten Kontrollproben war keine Mazeration aufgetreten.

SHERWOOD (1966) berichtete über eine nichtenzymatische Mazeration von Pflanzengeweben, bedingt durch hohe pH-Werte. In unseren Untersuchungen konnten bei pH 8,0 ähnliche Zerfallerscheinungen des Gurkengewebes durch pH-Einwirkungen

ausgeschlossen werden, da sonst auch bei der Verwendung undialysierter Kulturfiltrate, sowie in den hitzeinaktivierten Kontrollen, Beschädigungen des Gurkengewebes zu erwarten gewesen wären.

Bei der Verwendung von Kartoffelscheibchen anstelle des sehr empfindlichen Gurkengewebes hatte sich dieselbe Tendenz gezeigt, jedoch verlief der Mazerationsprozeß wesentlich langsamer. Es liegt also eine unterschiedliche Empfindlichkeit pflanzlicher Gewebe gegenüber mazerierenden Enzymen vor. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, daß es uns in orientierenden Vorversuchen nicht gelang, eine Mazeration von Halmgewebe junger Weizenpflanzen in vitro herbeizuführen und damit die Bedeutung der untersuchten Enzyme für die Pathogenese der Halmbruchkrankheit unmittelbar zu demonstrieren.

D. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Cercospora herpotrichoides Fron im Stande ist, in vitro spezifische Enzyme für den Abbau pektin- und cellulosehaltiger Substanzen zu bilden.

In Kulturfiltraten des Pilzes lassen sich nachweisen: endo-Polymethylglakturonase (endo-PMG), endo-Polyglakturonase (endo-PG), endo-Pektinmethyltranseliminase (endo-PMTE), Pektinmethylesterase (PME) sowie Cellulasen des C₁- und C_x-Typs.

Die Unterscheidung von zwei Enzymen des Polyglakturonase-Typs, nämlich einer pektinabbauenden PMG und einer pektatabbauenden PG, kann allerdings nur mit Vorbehalten vorgenommen werden. Der Kurvenverlauf in Abb. 20, der die Aktivität gegenüber beiden Substraten in Abhängigkeit vom pH-Wert demonstriert, läßt nämlich auch die Deutung zu, daß es sich lediglich um ein Enzym mit einer wenig ausgeprägten Substratspezifität handelt. Eindeutige Aussagen wären nur nach einer Trennung der verschiedenen Enzymkomponenten möglich.

1. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Enzymsynthese in vitro

Für die Bildung der Enzyme in vitro ist die Zusammensetzung des Nährmediums entscheidend. Dem Schrifttum ist zu entneh-

men, daß pektolytische Enzyme durch Zusatz von Pektin zur Nährlösung entscheidend gefördert werden können und deshalb als adaptiv anzusehen sind. Diese Tatsache trifft für viele pektinspaltende Enzyme pilzlichen Ursprungs zu (vgl. BATEMAN und MILLAR 1966), doch liegen andererseits auch Beobachtungen vor, nach denen eine konstitutive Bildung stattfindet (u.a. SINGH und HUSAIN 1964, AYERS und PAPAVIDAS 1965, GROSSMANN 1968).

Um den Einfluß des Nährmediums auf die PG-Aktivität von C. herpotrichoides zu prüfen, wurde die Bedeutung der C-Quelle näher untersucht. Die höchste Aktivität wurde durch Zusatz von Pektin zur Nährlösung erreicht. Reduzierte man den Pektinanteil der Nährlösung um 50 %, wurde auch die Enzymaktivität um nahezu den gleichen Prozentsatz vermindert. Ein Ausgleich der C-Menge durch Glukose führte zu einer weiteren Verminderung der Aktivität, während Cellulose als C-Ausgleich an Stelle von Glukose sich neutral verhielt.

Daraus geht hervor, daß die PG von C. herpotrichoides adaptiv gebildet wird.

Über die Bedeutung des pH-Wertes der Nährlösung für die Enzymproduktion liegen in der Literatur verschiedene Angaben vor. Für Rhizoctonia solani gilt, daß die PG-Synthese um pH 4,0 (BARKER und WALKER 1962) und die der Transeliminase bei pH 7,0 optimal verläuft (SHERWOOD 1966). Ähnlich hohe Werte begünstigen die PME-Produktion (BARKER und WALKER 1962). Diese Angaben lassen den Schluß zu, daß der pH-Wert einen Einfluß auf den Typ des zu bildenden Enzyms ausübt (HANCOCK 1965, BATEMAN 1966); möglich ist aber auch, daß die gefundenen Aktivitäten lediglich das Ergebnis einer unterschiedlichen pH-Stabilität der einzelnen Enzymkomponenten darstellen.

Auch in unseren Versuchen hat sich herausgestellt, daß die PG verstärkt bei tieferem pH-Wert gebildet wird. Günstig erwies sich eine Nährlösung mit pH 4,8. Da aber auch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,4 keine wesentliche Verschlechterung der PG-Aktivität ergab, verwendeten wir in unseren Versuchen ein Nährsubstrat mit diesem pH-Wert, bei dem eine reichliche Synthese aller untersuchten Enzymkomponenten ablief. Während des Pilzwachstums trat in der Kulturflüssig-

keit nach anfänglichem Abfall des pH-Wertes mit verlängerter Kulturdauer eine pH-Erhöhung ein. Dies war sicherlich für die Enzymausbeute nicht ohne Bedeutung. Um die pH-Verschiebung einzuengen, verwendeten wir eine gepufferte Nährlösung, die den pH-Wert im gewünschten Bereich hielt. Das beobachtete Absinken des pH-Wertes der Nährlösung zu Beginn der Entwicklung des Pilzes ist eine Erscheinung, die auch in Untersuchungen anderer Autoren mit verschiedenen Organismen festgestellt wurde. Allgemein wird vermutet, daß durch die Wirkung der PME aus den pektischen Substanzen Carboxylgruppen freigesetzt werden, was zur Erniedrigung des pH-Wertes der Nährlösung führen soll. Für C.herpotrichoides erscheint es aber sehr fraglich, ob die während der ersten beiden Wochen schwache PME-Aktivität genügend Carboxylgruppen freisetzt, um zu einer pH-Erniedrigung der gepufferten Lösung zu führen, zumal auch in der glukosehaltigen Nährlösung dieser pH-Abfall auftritt. Für diesen Prozeß dürften vielmehr vom Pilz ausgeschiedene organische Säuren verantwortlich gemacht werden.

Da nach den Untersuchungen von MARTIN (1967) bei Rhizoctonia solani sich eine erhöhte Enzymaktivität in Nährlösung durch spezifische, das Wachstum stimulierende Veränderung der Vorkultur des Pilzes erreichen läßt, ist auch bei C.herpotrichoides versucht worden, durch Anzucht des Impfmateri- als auf pektin- bzw. cellulosehaltigem Agar eine Verbesserung der pektolytischen und cellulolytischen Fähigkeiten des Pilzes zu erzielen. Es zeigte sich aber, daß die Vorkultur von C.herpotrichoides keinen Einfluß auf die Enzymaktivität in den nachfolgenden Flüssigkeitskulturen hatte.

Dagegen hatte, wie zu erwarten, die Kulturdauer einen entscheidenden Einfluß auf die Aktivität. Nach einem starken Anstieg innerhalb der ersten vier Wochen war das Optimum erreicht und mit verlängerter Kulturdauer setzte ein Abfall der PG-Aktivität ein. Daß mit der Aktivitätsänderung eine pH-Verschiebung in der Nährlösung entgegengesetzt parallel lief, stimmt mit Beobachtungen von BATEMAN (1967) überein. In seinen Untersuchungen mit R.solani geht mit steigendem pH-Wert des ungepufferten Nährmediums eine Abnahme der PG-Aktivität einher. Für diese Deutung auch unserer Versuche

spricht, daß die PG-Aktivität der Stämme 98/2 und 194 jeweils nach Erreichen eines pH-Wertes der Nährlösung um pH 5,8 absank.

Versuche, die Enzymausbeute durch Schüttelkulturen zu erhöhen, verliefen negativ. Trotz Steigerung des Myzelwachstums lieferten sie eine geringere pektolytische Aktivität als Ruhekulturen. Vermutlich war die unterschiedliche Myzelausbildung in den Ruhe- und Schüttelkulturen für die Enzymaktivität verantwortlich. In den Schüttelkulturen kam es nicht zur Ausbildung einer geschlossenen Myzeldecke wie bei den Ruhekulturen. Das läßt sich mit Beobachtungen von GROSSMANN (1968) in Einklang bringen, nach denen die höchste pektolytische Aktivität von Phytophthora infestans unter dichten, oberflächlichen Myzeldecken erreicht wird, während sie bei submers wachsenden Myzelien wesentlich geringer ist.

Bei der Suche nach der optimalen Temperatur für die Enzymproduktion durch C.herpotrichoides ist zu berücksichtigen, daß uns Isolate mit unterschiedlichen Temperaturansprüchen zur Verfügung standen. Nach den Untersuchungen von LANGE-DE LA CAMP (1967) haben Roggentypen im Vergleich mit Weizentypen ihre höchste Infektiosität bei niedrigeren Temperaturen. Unter der Voraussetzung, daß ein Zusammenhang zwischen der Aggressivität der einzelnen Isolate und ihrer Fähigkeit, zellwandzerstörende Enzyme zu bilden, besteht, ist zu erwarten, daß der R-Typ (Stamm 43/1) auf tiefere Temperaturen mit einer erhöhten Enzymsynthese reagiert. Tatsächlich zeigte der Roggenstamm eine Bevorzugung niedriger Temperaturen und erreichte bei 5 - 10°C die höchste PG-Aktivität. Freilich konnten wir nur einen als R-Typ definierten Stamm prüfen, so daß allgemein gültige Aussagen nicht möglich sind.

Bei einer Übertragung dieser in vitro erzielten Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo ist ferner zu berücksichtigen, daß für die Befallsstärke das Wechselspiel zwischen Wirt und Parasit von Bedeutung ist. Diese Zusammenhänge, die LANGE-DE LA CAMP (1967) ausführlich diskutiert, sollen hier nicht näher erörtert werden.

Auch die Bildung der Transeliminase (PTE) ist vom Nährmedium abhängig. Wie bei der PG war nur in Gegenwart von Pektin eine Synthese des Enzyms zu beobachten, wobei allerdings keine so starke Ausnutzung des Pektins vorlag, da auch die Reduzierung der Pektin-Konzentration auf die Hälfte noch genügend Substrat für eine beachtliche Aktivität lieferte. Zusatz von Glukose schien hier keine so ausgeprägte Depression zu verursachen wie bei der PG.

Das pH-Optimum für die PTE-Produktion liegt bei pH 5,4, also etwas höher als für die PG. Dieses Resultat paßt zu den Ergebnissen von BATEMAN (1967) für R. solani, wonach mit steigendem pH-Wert des ungepufferten Nährmediums eine Abnahme der PG-Aktivität und eine Zunahme der PTE-Aktivität einhergeht.

Nach einer Kulturdauer von 6 Wochen erreichte die Aktivität der PTE ihr Optimum, um dann bis zum Versuchsende nach 12 Wochen fast auf 0 herabzusinken. Im Gegensatz zur Polygalakturonase scheint die Transeliminase weniger stabil zu sein.

Auch die Synthese des zuletzt geprüften pektolytischen Enzyms, der Pektinmethylesterase (PME), ist an die Gegenwart von Pektin in der Nährlösung gebunden. Die Aktivität entwickelte sich in ähnlicher Weise wie bei der PTE, eine Verringerung des Pektinanteils um 50% konnte durch Maltzin voll ausgeglichen werden. Dagegen schien sich, ähnlich wie bei der PG, Glukose hemmend auszuwirken.

Die bei pH 4,8 und 5,4 gepufferten Nährlösungen erlaubten die höchste PME-Synthese. Daß die weitere leichte pH-Erhöhung noch eine Verbesserung der Aktivität bringen könnte, ließe sich aus dem Anstieg des pH-Wertes und der gesteigerten Aktivität nach der vierten Woche vermuten. Eindeutig ist aber, daß wie bei den bisher besprochenen pektolytischen Enzymen bei pH 6,2 schon fast keine Aktivität mehr festzustellen war.

Bei Ausdehnung der Kulturdauer bis zu 6 Wochen war ein stetiger Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf sank aber auch hier, ähnlich wie bei der PTE, die Aktivität bis zum Versuchsende nach 12 Wochen nahezu auf 0 ab.

Im Gegensatz zu den pektolytischen Enzymen zeigte die C_x-Cellulase in ihrer Aktivität keine deutliche Abhängigkeit von der angebotenen C-Quelle im Nährmedium. Vielmehr war bei allen verwendeten C-Quellen eine deutliche C_x-Aktivität nachzuweisen, wobei durch Zusatz von Hefeextrakt eine drastische Förderung eintrat. Die höchsten C_x-Aktivitäten wurden im hefehaltigen Nährsubstrat mit 1% Glukose als C-Quelle erreicht. Eine Erhöhung der Glukose auf 2 und 3% brachte trotz gesteigerter Myzelproduktion keine weitere Verbesserung der cellulolytischen Aktivität. Denkbar ist, daß es zwischen verschiedenen synthetisierenden Systemen zu einer Konkurrenz kommt, wobei die weitere Enzymsynthese zugunsten der Myzelproduktion eingestellt wird. Da Glukose den günstigsten Einfluß auf die C_x-Produktion hatte, verminderte eine Verringerung des Glukoseanteils auf 0,5% - bei gleichzeitigem Ersatz durch eine andere C-Quelle - die C_x-Aktivität um nahezu 50%.

Die Beobachtung von HORTON und KEEN (1966), daß bei Pyrenochaeta terrestris Glukose in höheren Konzentrationen (es wird ein Schwellenwert von $5 \times 10^{-4} M$ angegeben) in Gegenwart von Cellulose die Cellulasesynthese reprimiert, trifft für C. herpotrichoides nicht zu. Vielmehr war die cellulolytische Aktivität bei der Kombination Cellulose + Glukose (je 0,5%) höher als bei Cellulose (1,0%) als alleiniger C-Quelle. Daß Maltzin auf Grund seines Vitamingehaltes fördernd wirkte, zeigt sich beim Vergleich der Maltzinvarianten mit und ohne Hefeextrakt. Die Zugabe von Hefeextrakt (0,1%) zur Maltzinlösung hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Enzymsynthese. Auch in allen Kombinationen, die 0,5% Maltzin als Teilkomponente enthielten, war die Wirkung der Hefe bedeutend geringer als in maltzinfreien Nährsubstraten. Die Ergebnisse über den Einfluß der C-Quelle auf die C_x-Cellulasebildung machen deutlich, daß dieses Enzym konstitutiv gebildet wird.

Der günstigste pH-Bereich für eine reichliche C_x-Produktion liegt um pH 5,0, wobei pH 5,4 dem tieferen Wert 4,8 überlegen ist. Das gilt vor allem für die Anfangsphase des Pilz-

wachstums, in der ein Absinken des pH-Wertes der Nährlösung beobachtet wurde. Dadurch bewegte sich vermutlich der pH-Wert in der Lösung vom Ausgangswert pH 4,8 kurzfristig in einem für die Enzymsynthese ungünstigen Bereich. Erst mit steigendem pH-Wert setzte eine verstärkte Enzymbildung ein. Nach 6 Wochen ließen sich aus beiden Varianten nahezu die gleichen Ergebnisse ermitteln. Gepufferte Nährlösungen von pH 6,2 erbrachten ebenso wie ungepufferte Medien mit einem Ausgangswert von pH 5,4, in denen jedoch der pH-Wert rasch anstieg, nur geringe Aktivitäten.

Nach einer Kulturdauer von 6 Wochen wurde mit der Beendigung der Myzelproduktion die höchste C_x -Aktivität erreicht. Im Gegensatz zu den pektolytischen Enzymen, die in den folgenden 6 Wochen deutlich an Aktivität einbüßen, liegt die C_x -Aktivität nach insgesamt 12 Wochen nahezu unverändert vor. Dieses Enzym scheint sehr stabil zu sein und durch stoffliche Umsetzungen in den Kulturgefäßen kaum beeinflusst zu werden.

Schüttelkulturen lieferten - ähnlich wie bei den pektolytischen Enzymen - trotz höchster Myzelgewichte eine geringere cellulolytische Aktivität als Ruhekulturen. NORKRANS (1963b) macht für die geringe cellulolytische Aktivität der Filtrate aus Schüttelkulturen mechanische Schädigungen der Enzyme verantwortlich. Befunde verschiedener Autoren mit anderen Organismen widersprechen jedoch dieser Auffassung (z.B. LYR 1964, VARADI und JURÁSEK 1970). Für C. herpothermophilus hat sich herausgestellt, daß ein 30stündiges Schütteln der Kulturfiltrate keine nachteiligen Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat, wenn damit natürlich auch nicht ausgeschlossen ist, daß es bei verlängerter Einwirkungszeit zu Schädigungen kommen kann.

Bei der Ermittlung der optimalen Temperatur für die C_x -Produktion ließen sich dieselben Tendenzen erkennen, wie sie für die PG-Synthese beschrieben sind. Der R-Typ bevorzugte auch zur Bildung der C_x -Cellulase den niederen Temperaturbereich, während die W-Typen bei 20°C die höchste Enzymsausbeute lieferten.

Neben der C_x -Cellulase bildet C. herpotrichoides auch eine Cellulase des C_1 -Typs und ist somit in der Lage, native Cellulose anzugreifen. Bei der Überprüfung der Nährmedien zeigte sich, daß bei Linterspulver als C-Quelle eine hohe C_1 -Aktivität auftrat. Dies stimmt mit den Angaben von NORKRANS (1967) überein. Sie berichtet über eine erhöhte C_1 -Aktivität der Organismen, die auf Cellulose wachsen. Von unseren beiden geprüften Stämmen erreichte Stamm 98/2 auf Linterspulver und Stamm 194 auf Pektin die höchste Enzymaktivität. Die Bildung der C_1 -Cellulase auf diesen beiden C-Quellen scheint uns für die Pathogenese der Halmbruchkrankheit sehr wesentlich zu sein, da der Pilz beim Angriff auf die Pflanze auch Barrieren aus diesen Materialien überwinden muß.

Mit verlängerter Kulturdauer erreichte auch die C_1 -Cellulase eine gesteigerte Aktivität. Es zeigte sich, daß die Enzymwirkung bei einem direkten Kontakt des Pilzes mit dem Substrat stärker war als bei bloßer Einwirkung der Kulturlösung. Vermutlich lagen im ersten Fall höhere lokale Konzentrationen der Cellulase vor. Dafür spricht, daß der als Indikator verwendete Baumwollfaden anfänglich bevorzugt an der Kontaktstelle mit dem Pilz riß, während bei verlängerter Kulturdauer diese Bevorzugung nicht mehr zu erkennen war.

2. Eigenschaften der untersuchten Enzyme

Für den Abbau von Pektin bzw. Pektat durch Enzyme des Polygalakturonase-Typs stellte sich ein unterschiedliches pH-Optimum heraus. So wurde Pektin bevorzugt bei pH 4,5, Pektat bei pH 5,0 - 5,5 abgebaut. Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben anderer Autoren überein, wonach Polygalakturonasen pilzlichen Ursprungs allgemein im sauren pH-Bereich ihr Wirkungsoptimum besitzen.

Wesentlich für die PG-Aktivität ist die Wahl des Puffersystems, das während der Reaktionszeit den gewünschten pH-Wert aufrecht erhalten soll. So hemmte Citrat als Puffersubstanz die PG-Aktivität um so intensiver, je größer der Citratanteil an der Puffermischung war. Phosphat- und

Azetatpuffer beeinträchtigten in einer Konzentration von 0,1M die Aktivität nicht; erst höhere Konzentrationen wirkten sich aktivitätsmindernd aus.

Setzte man Kulturfiltrate des Pilzes 14 Stunden extremen pH-Werten aus, so wurde die PG-Aktivität vermindert. Die pH-Stabilität des Enzymes war bei pH 1,0 und pH 12,0 sehr gering und das Enzym wurde irreversibel geschädigt, während pH-Werte zwischen 3,0 und 9,0 zu keiner Veränderung der Aktivität führten.

Durch die Einwirkung hoher Temperaturen wurde die PG-Aktivität empfindlich gemindert. Schon 30minütiges Erwärmen auf 35°C führte zu einem Aktivitätsverlust, zwischen 40°C und 50°C war ein rapider Aktivitätsabfall zu verzeichnen und bei 60°C wurde eine totale Inaktivierung erreicht. Die geringe Temperaturstabilität der pilzlichen Polygalakturonasen wird auch von anderen Autoren erwähnt. Doch lassen sich keine konkreten Vergleiche anstellen, da von den Autoren unterschiedlich lange Einwirkungszeiten verwendet wurden, was auf die Denaturierung des Enzyms einen Einfluß hat. Außerdem spielt es eine Rolle, mit welchen pH-Werten die Kulturfiltrate den erhöhten Temperaturen ausgesetzt werden. Unsere Kulturfiltrate wurden vor dem Erhitzen auf pH 7,0 eingestellt, da sich herausgestellt hatte, daß Proben mit tieferen pH-Werten auf hohe Temperaturen empfindlicher reagieren.

Das Wirkungsoptimum der Transeliminase liegt bei pH 8,0. Sie weicht somit vom pH-Optimum einiger anderer Pektin-methyl-Transeliminassen pilzlichen Ursprungs, für die ein pH-Optimum von ca. 5,0 gefunden wurde (ALBERSHEIM et al. 1960, EDSTROM und PHAFF 1964, GROSSMANN 1968), ab und ähnelt in dieser Hinsicht mehr Transeliminassen von Bakterien, die allerdings Pektat bevorzugt angreifen (NAGEL und VAUGHN 1961, STARR und MORAN 1962). Jedoch steht die Transeliminase von C. herpotrichoides nicht ohne Parallele aus der Literatur da. So bilden Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea (SHERWOOD 1966), Fusarium oxysporum f. melonis (MARALTE und MEYER 1968) sowie F. oxysporum f. lycopersici (MENKE, unveröffentlicht) ebenfalls Transeliminassen, die

Pektin im alkalischen Bereich spalten.

In ähnlicher Weise, wie EDSTROM und PHAFF (1964) es für die Pektinmethyl-Transeliminase von Aspergillus fonsecaeus erstmals beschrieben haben, wurde das vorliegende Enzym durch Ca-Ionen weitaus stärker als durch andere Kationen stimuliert und durch die Art der Pufferung in seiner Aktivität beeinflusst. So ergab lediglich 0,5-0,1M Tris/HCl-Puffer eine gute Enzymaktivität, während Phosphat- und Citratpuffer unbrauchbar waren.

Die Transeliminase mit ihrem Wirkungsoptimum bei pH 8,0 zeigt eine nach der alkalischen Seite hin verschobene Toleranz. Während bei pH 12,0 die Aktivität nur um ca. 50% verringert wurde, war sie bei tieferen pH-Werten weitaus stärker vermindert.

Hinsichtlich der Temperaturstabilität gleicht die Transeliminase der PG. Auch hier wirkte schon eine 30minütige Erhöhung der Temperatur auf 35°C schädigend und führte zu einem Aktivitätsverlust von etwa 10%, während eine völlige Inaktivierung bei 60°C eintrat.

Das pH-Optimum der Pektinmethylesterase von C. herpotrichoides liegt bei pH 7,5. Im gleichen Bereich entwickeln z.B. die Pektinmethylesterasen von Rhizoctonia solani (BATEMAN 1963), Phytophthora infestans (GROSSMANN 1968) und Mycosphaerella citrullina (CURREN 1969) ihr Wirkungsoptimum, obwohl pilzlichen Pektinmethylesterasen generell ein Wirkungsoptimum bei niedrigeren pH-Werten zugeschrieben wird (McCOLLOCH und KERTESZ 1947, BATEMAN und MILLAR 1966). Auf die Bedeutung der NaCl-Zugabe für die Aktivität dieses Enzyms haben McCOLLOCH und KERTESZ schon 1947 hingewiesen. Sie haben mit kommerzieller Pektinase ("Pectinol") bei einem pH-Optimum von 5,0 nach Zugabe von 0,1M NaCl eine Steigerung der PME-Aktivität um 100% erreichen können. Nach Angaben von BATEMAN (1963) vermag die pilzliche PME, im Gegensatz zu der höherer Pflanzen jedoch auch ohne NaCl-Zusatz Pektin zu hydrolysieren. Übereinstimmend damit war die PME von C. herpotrichoides in NaCl-freien Lösungen wirksam, wurde aber in ihrer Aktivität durch NaCl gefördert.

Die günstigste NaCl-Konzentration lag bei 0,085M; ab 0,1M begann schon eine Depression, aber noch eine Konzentration von 0,5M bedingte gegenüber NaCl-freien Präparationen eine erhöhte Aktivität.

Die Pektinmethylesterase - mit einem pH-Wirkungsoptimum von 7,5 - wurde vor allem durch die Einwirkung extrem tiefer pH-Werte geschädigt. Das Enzym erreichte nach Einwirkung von pH 1,0 ca. 30%, nach pH 9,0 100% und nach pH 12,0 ca. 60% der maximalen Aktivität.

Aus den Ergebnissen der Abb.22 und Abb.34 sowie Tab.11 läßt sich eine Beziehung zwischen der pH-Stabilität der einzelnen Enzyme und deren pH-Wirkungsoptimum erkennen. Die Transeliminase sowie die Pektinmethylesterase, die ihre höchste Aktivität im alkalischen Bereich entwickelten, waren gegen die Einwirkung extrem hoher pH-Werte weniger empfindlich als die Polygalakturonase mit einem Wirkungsoptimum bei pH 4,5.

Die Temperaturstabilität scheint bei allen pektolytischen Enzymen etwa gleich groß zu sein, wie sich beim Vergleich der Ergebnisse der entsprechenden Versuche zeigt (vgl. Abb.21 und 33, sowie Tab.10).

Die C_x-Cellulase unterscheidet sich in ihren Eigenschaften zum Teil recht beträchtlich von den pektolytischen Enzymen. Das pH-Optimum der Cellulase bewegt sich um pH 6,0 und ähnelt darin C_x-Cellulasen anderer Pilze (z.B. Phytophthora infestans, GROSSMANN 1968; Verticillium albo-atrum, WHITNEY et al. 1969; Mycosphaerella citrullina, CURREN 1969).

Bei der Verwendung verschiedener Puffer zeigte sich, im Gegensatz zu den pektolytischen Enzymen, keinerlei Beeinflussung der Aktivität.

Auch hinsichtlich der pH-Stabilität liegen Unterschiede zu den pektolytischen Enzymen vor. Die C_x-Cellulase wies eine größere Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung extremer pH-Werte auf und blieb nur etwa zwischen pH 4,5 und pH 7,5 stabil. Hierin findet sich eine gute Übereinstimmung mit den Versuchen von PETTERSSON und ANDERSSON (1968), die zeigen konnten, daß eine Veränderung der Molekülstruktur bei

pH-Werten unter 4,0 und oberhalb 8,5 die Cellulase von Penicillium notatum unwirksam werden läßt. Auffallend ist die bessere Verträglichkeit gegenüber pH 1,0 im Vergleich zu pH 12,0; auch hierin unterscheidet sich die C_x-Cellulase von den pektolytischen Enzymen.

Versuche zur Temperaturstabilität ergeben, daß die C_x-Cellulase gegenüber höheren Temperaturen wesentlich unempfindlicher ist als die pektolytischen Enzyme. Selbst nach 30minütiger Erhitzung auf 90°C war die cellulolytische Aktivität nicht vollständig zerstört.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die C_x-Cellulase von C. herpotrichoides offenbar wesentlich robuster ist als die pektolytischen Enzyme des Pilzes. Eine Besonderheit der C_x-Cellulase ist, daß sie durch Dialysieren in ihrer Aktivität geschwächt wird. Unsere Ergebnisse und die Mitteilung von HALLIWELL (1961) lassen vermuten, daß die Cellulase vom Cellulosematerial des Dialysierschlauches festgelegt wird.

3. Die Mazeration pflanzlicher Gewebe im Zusammenhang mit der Pathogenese der Helmbruchkrankheit

Kulturfiltrate von C. herpotrichoides weisen eine mazerierende Aktivität auf. In älteren Arbeiten wurde die Mazeration pflanzlicher Gewebe auf die Wirkung einer sogenannten Protopektinase, die unlösliche Pektine in lösliche überführen soll, zurückgeführt. Die Existenz dieser Protopektinase wird jedoch vielfach angezweifelt, da ihr Nachweis nicht mit Sicherheit erbracht werden konnte (KERTESZ und MCCOLLOCH 1950, WINSTEAD und WALKER 1954, ELAROSI 1958). Vielmehr wird vermutet, daß unter Protopektinase ein System verwandter Enzyme zu verstehen sei. Das verdeutlichen Ergebnisse neueren Datums, die mit gereinigten Enzympräparaten gewonnen wurden. Danach werden vorwiegend endo-Formen der Glykosidasen und Lyasen für den Mazervationsprozeß verantwortlich gemacht (BATEMAN 1964, MCCLENDON 1964, DEAN und WOOD 1967, SUZUKI et al. 1967, BATEMAN 1968, TURNER und BATEMAN 1968, ATERS et al. 1969 und andere).

Die Beteiligung anderer Faktoren (vgl. Zusammenstellung bei BYRDE und FIELDING 1968) ist jedoch nicht auszuschließen,

wenn sich auch die Behauptung, daß die α -L-Arabinofuranosidase von Sclerotinia fructigena am Mazerationsprozeß beteiligt ist (BYRDE und FIELDING 1965), nicht aufrecht erhalten läßt (BYRDE und FIELDING 1968).

Die mazerierende Wirkung der Kulturfiltrate von C. herpotrichoides bei pH 4,5 deutet auf die Wirkung von Enzymen des Polygalsakturonase-Typs hin. Die aktivitätsmindernde Wirkung der Dialyse könnte auf einem Verlust an dialysierbaren Aktivatoren beruhen. Ähnliche Vermutungen äußern auch BYRDE und FIELDING (1968), bei denen gereinigte PG-Proben ebenfalls eine äußerst schwache Aktivität aufwiesen. Bei pH 8,0 kann die Transeliminase für den Gewebezerfall verantwortlich gemacht werden. Dafür spricht einerseits, daß nur mit dialysierten Kulturfiltraten eine transeliminative Pektinspaltung sowie eine Mazeration der Gurkenscheiben nachweisbar war. Andererseits läßt auch die Tatsache, daß der Mazerationsprozeß bei pH 8,0 - nicht aber bei pH 4,5 - durch Zugabe von CaCl_2 eine geringe Beschleunigung erfuhr, diesen Schluß zu. Da andererseits durch Phosphat-Puffer zwar die PTE-Aktivität, nicht aber die Mazeration beeinträchtigt wurde, scheint eine Mitwirkung weiterer Faktoren am Mazerationsvorgang vorzuliegen.

Kulturfiltrate, die eine ausgeprägte cellulolytische, jedoch lediglich eine geringe pektolytische Aktivität aufwiesen, führten nur eine leichte Beschädigung des Gurkengewebes herbei. Daraus ist zu folgern, daß von den beiden Enzym-Komplexen den pektolytischen Enzymen bei der Mazeration eine übergeordnete Funktion zukommt. Das stimmt auch mit der Auffassung von BATEMAN und MILLAR (1966) überein, die den cellulolytischen Enzymen bei der Mazerierung pflanzlicher Gewebe keine entscheidende Rolle zuschreiben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß C. herpotrichoides in der Lage ist, pektolytische und cellulolytische Enzyme in vitro zu bilden, die, wie DEFOSSE (1971) auf Grund histochemischer Befunde vermutet, für die Pathogenese der Halmbruchkrankheit von Bedeutung sein dürften. Mit dem Nachweis dieser Enzyme ist es möglich, die von MIELKE (1970) ge-

gefundenen Unterschiede im Rohfasergehalt gesunder und befallener Halmportionen neu zu deuten. MIELKE macht für den niederen Rohfasergehalt infizierter Pflanzen eine gestörte Rohfaserproduktion verantwortlich. Nach den vorliegenden Befunden ist nunmehr nicht auszuschließen, daß der Rohfasergehalt auch durch enzymatische Einwirkungen verringert wird.

Das von C. herpotrichoides an der Halmbasis der Wirtspflanzen hervorgerufene Schadbild, der Augenfleck, findet eine Parallele in den von Rhizoctonia solani an Bohnen erzeugten Läsionen. In deren Randzonen fand BATEMAN (1964) eine Anreicherung von Calcium. BATEMAN vermutet, daß es nach einer Demethoxylierung der pektischen Substanzen zur Bildung von Ca-Pektaten kommt, die dem enzymatischen Abbau widerstehen. Dieser Mechanismus führt zu einer Begrenzung der sich entwickelnden Läsionen. Ob sich bei der Symptomausprägung auf den von C. herpotrichoides befallenen Halmen ähnliche Vorgänge abspielen, ist nicht bekannt, auf Grund der in vitro gefundenen Enzym-Aktivitäten jedoch denkbar. Eine weitere Klärung der Rolle pektolytischer und cellulolytischer Enzyme bei der Pathogenese der Halmbruchkrankheit ist nur mit Hilfe von Untersuchungen in vivo, d.h. also an der infizierten Pflanze, möglich.

E. Zusammenfassung

1. Zwanzig Isolate von Cercospora herpotrichoides Fron, dem Erreger der Halmbruchkrankheit des Weizens, wurden auf ihre Fähigkeit, pektolytische und cellulolytische Enzyme in vitro zu bilden, untersucht. Alle Isolate waren zur Bildung dieser Enzyme, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, befähigt.
2. In den Kulturfiltraten des Pilzes wurden folgende Enzyme nachgewiesen und in einigen ihrer Eigenschaften charakterisiert: endo-Polygalakturonase (endo-PG) und/oder endo-Polymethylgalakturonase (endo-PMG), endo-Pektinmethyl-Transeliminase (endo-PMTE), Pektinmethylesterase (PME) sowie Cellulasen des C_1 - und C_x -Typs.
3. Die Bildung der pektolytischen Enzyme war an die Gegenwart von Pektin in der Nährlösung gebunden. Eine C_x -Aktivität trat dagegen auch in Nährmedien ohne Cellulose auf.
4. Von wesentlichem Einfluß für die C_x -Aktivität war die Zugabe von Hefeextrakt zur Nährlösung.
5. Für die Enzyme mit einem niederen pH-Wirkungsoptimum (Enzyme des Polygalakturonase-Typs) erwies sich eine Kultivierung bei pH 4,8 am geeignetsten. Enzyme mit höherem pH-Wirkungsoptimum (Pektinmethylesterase, Pektinmethyltranseliminase, C_x -Cellulase) wurden bei pH 5,4 stärker gebildet; bei pH 6,2 lief nur eine schwache Enzymproduktion ab. Die Verwendung von 0,2M Phosphat-Puffer minderte die im Verlauf des Wachstums auftretenden pH-Verschiebungen des Nährsubstrates und begünstigte dadurch die Enzymsynthese.
6. Kulturfiltrate von Schüttelkulturen lieferten, trotz höherer Myzelgewichte, geringere pektolytische und cellulolytische Aktivitäten als solche aus Ruhekulturen.
7. Belichtete Kulturen erbrachten ohne Beeinflussung der Myzelproduktion höhere Enzymaktivitäten als unbelichtete.
8. Roggen- und Weizen-Typen zeigten hinsichtlich der Enzymproduktion unterschiedliche Temperatursprüche. Ein R-Typ hatte sein Optimum bei 5°C, während W-Typen bei

20°C die höchste Enzymsausbeute lieferten.

9. Für die Enzyme des Polygalakturonase-Typs wurden die pH-Optima sowohl viskosimetrisch als auch reduktometrisch im Bereich von pH 4,5 - 5,5 ermittelt.

Für die Bestimmung der Transeliminase-Aktivität wurde die Absorption bei 230nm bzw., nach Durchführung der Thiobarbitursäurerreaktion, bei 550nm gemessen. Dieses Enzym hatte ein pH-Optimum von pH 8,0 und wurde in seiner Aktivität durch Ca^{++} besonders gefördert.

Das durch Titration mit NaOH bestimmte pH-Optimum der Pektinmethylesterase lag bei pH 7,5. NaCl erhöhte die Enzymaktivität.

Die C_x -Cellulase hatte, wie viskosimetrische Messungen und die Bestimmung reduzierender Gruppen in den Reaktionsprodukten ergaben, ihr pH-Optimum bei pH 6,0.

Die C_1 -Aktivität wurde mit Hilfe der Reißfestigkeit von Baumwollfäden bestimmt. Sie trat sowohl in Gegenwart des Pilzes als auch in zellfreien Kulturfiltraten auf. Ihre Einwirkung war bei direktem Kontakt des Pilzes mit den Baumwollfäden am stärksten.

10. Die pektolytischen Enzyme reagierten auf die Einwirkung hoher Temperaturen empfindlicher als die C_x -Cellulase.
11. Durch Exposition der Kulturfiltrate bei extrem hohen bzw. niedrigen pH-Werten wurde die enzymatische Aktivität empfindlich vermindert. Enzyme mit hohem pH-Wirkungsoptimum wurden bei pH 12,0 weniger geschädigt als Enzyme mit niedrigerem pH-Optimum.
12. Kulturfiltrate von C. herpotrichoides entwickelten mazerierende Eigenschaften. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird vermutet, daß mehrere Enzymkomponenten am Mazerationsprozeß beteiligt waren.
13. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen berechtigen zu der Annahme, daß die von Cercospora herpotrichoides gebildeten Enzyme wesentlich zur Vermorschung der Halmgewebe und damit zur Pathogenese der Halmbruchkrankheit beitragen.

F. Schriftenverzeichnis

- ALBERSHEIM, P., H. NEUKOM und H. DEUEL, 1960: Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. Helv.chim.Acta 43, 1422-1426.
- ALBERSHEIM, P., T.M. JONES and P.D. ENGLISH, 1969: Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. A.Rev.Phytopath. 7, 171-194.
- AYERS, W.A., and G.C. PAPAIVIZAS, 1965: An exocellular pectolytic enzyme of Aphanomyces euteiches. Phytopathology 55, 249-253.
- AYERS, W.A., G.C. PAPAIVIZAS and A.F. DIEM, 1966: Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani. Phytopathology 56, 1006-1011.
- AYERS, W.A., G.C. PAPAIVIZAS and R.D. LUMSDEN, 1969: Purification and properties of the endopolygalacturonase of Aphanomyces euteiches. Phytopathology 59, 925-930.
- BARKER, K.R., and J.C. WALKER, 1962: Relationship of pectolytic and cellulolytic enzyme production by strains of Pellicularia filamentosa to their pathogenicity. Phytopathology 52, 1119-1125.
- BATEMAN, D.F., 1963: The "macerating" enzyme of Rhizoctonia solani. Phytopathology 53, 1178-1186.
- BATEMAN, D.F., 1964: An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in Rhizoctonia-infected hypocotyls of bean. Phytopathology 54, 438-445.
- BATEMAN, D.F., 1966: Hydrolytic and transeliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of Fusarium solani f. phaseoli. Phytopathology 56, 238-244.
- BATEMAN, D.F., 1967: Alteration of cell wall components during pathogenesis by Rhizoctonia solani. In: MIROCHA, C.J., and J. ORITANI: The dynamic role of molecular constituents in plant-parasite interaction, pp.58-79. The American Phytopathological Society, Inc. St.Paul, Minnesota.
- BATEMAN, D.F., 1968: The enzymatic maceration of plant tissue. Neth.J.Pl.Path. 74, Suppl.1, 67-80.
- BATEMAN, D.F., and R.L. MILLAR, 1966: Pectic enzymes in tissue degradation. A.Rev.Phytopath. 4, 119-146.
- BeMILLER, J.N., D.O. TEGTMEIER and A.J. PAPPELIS, 1968: Cellulolytic activity of Diplodia zaeae. Phytopathology 58, 1336-1339.

- BROWN, W., 1915: Studies in the physiology of parasitism. I. The action of Botrytis cinerea. Ann.Bot. 29, 313-348.
- BYRDE, R.J.W., and A.H. FIELDING, 1965: An extracellular α -L-arabinofuranosidase secreted by Sclerotinia fructigena. Nature, Lond. 205, 390-391.
- BYRDE, R.J.W., and A.H. FIELDING, 1968: Pectin methyltrans-eliminase as the maceration factor of Sclerotinia fructigena and its significance in brown rot of apple. J.gen.Microbiol. 52, 287-297.
- CAVALLI-SFORZA, L., 1969: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- CURREN, T., 1969: Pectic and cellulolytic enzymes produced by Mycosphaerella citrullina and their relation to black rot of squash. Can.J.Bot. 47, 791-794.
- DEAN, M., and R.K.S. WOOD, 1967: Cell wall degradation by a pectic transeliminase. Nature, Lond. 214, 408-410.
- DEBRUCK, J., 1965: Untersuchungen über die Wirkung von Stroh-Gründüngung und Stickstoffdüngung auf Fußkrankheiten und Ertragsbildung beim Getreide. Z.Acker- u.PflBau 123, 75-105.
- DEFAGO, G., 1941: Effets de l'œneurine, de ses composants et de l'hétéro-auxine sur la croissance de trois parasites du blé. Phytopath.Z. 13, 293-316.
- DEFOSSE, L., 1971: Recherches histochimiques sur la pénétration du Cercospora herpotrichoides Fron dans les gaines foliaires des céréales. Phytopath.Z. 70, 1-10.
- DIERCKS, R., 1963: Zur Bekämpfung der Halmbruchkrankheit des Getreides mit chemischen Mitteln. Mitt.biol. Bundanst.Ld- u.Forstw. 108, 133-142.
- DIERCKS, R., 1965: Die Bekämpfung der Halmbruchkrankheit des Getreides (Cercospora herpotrichoides) unter besonderer Berücksichtigung der chemischen Verfahren. Bayer.landw.Jb. 42, Sonderheft 4.
- DIERCKS, R., 1966: Die meteorologischen Grenzen bei Voraussage einer Halmbruch-Epidemie unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in Süddeutschland. Z.Pfl.Krankh.PflPath.PflSchutz 73, 117-137.
- DINGLE, J., W.W. REID and G.L. SOLOMONS, 1953: The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. J.Sci.Fd Agric. 4, 149-155.
- DURBIN, R.D., and J.D. HUPPLER, 1965: Some problems in the determination of hydrolytic enzyme activity. Phytopathology 55, 471-472.

- EDSTROM, R.D., and H.J. PHAFF, 1964: Eliminative cleavage of pectin and of oligogalacturonide methyl esters by pectin trans-eliminase. J.biol.Chem. 239, 2409-2415.
- ELAROSI, H., 1958: Fungal associations. III. The role of pectic enzymes of the synergistic relation between Rhizoctonia solani Kühn and Fusarium solani Snyder and Hansen. Ann.Bot. 22, 399-416.
- ERIKSSON, K.E., and B. PETTERSSON, 1968: Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus Stereum sanguinolentum for the breakdown of cellulose. II. Purification of the cellulase. Archs Biochem.Biophys. 124, 142-148.
- ERIKSSON, K.E., and W. RZEDOWSKI, 1969: Extracellular enzyme system utilized by the fungus Chrysosporium lignorum for the breakdown of cellulose. II. Separation and characterization of three cellulase peaks. Archs Biochem.Biophys. 129, 689-695.
- FEHRMANN, H., 1970: Bekämpfung der Halmbruchkrankheit des Weizens mit Benomyl. Nachr.Bl.dt.PflSchutzdienst.,Stuttg. 22, 136-139.
- FREY-WYSSLING, A., 1969: The ultrastructure and biogenesis of native cellulose. Fortschr.Chem.org.Naturst. 27, 1-30.
- FREY-WYSSLING, A., and K. MÜHLETHALER, 1963: Die Elementarfibrillen der Cellulose. Makromol.Chem. 62, 25-30.
- FUCHS, W.H., und F. GROSSMANN, 1960: Kalkstickstoffversuche zu halmbruchkrankem Weizen. Agrochimica 4, 216-235.
- GARRETT, S.D., 1963: A comparison of cellulose-decomposing ability in five fungi causing cereal foot rots. Trans.Br.mycol.Soc. 46, 572-576.
- GILLIGAN, W., and E.T.REESE, 1954: Evidence for multiple components in microbial cellulases. Can.J.Microbiol. 1, 90-107.
- GROSSMANN, F., 1962: Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von Fusarium oxysporum f. lycopersici. I. Hemmung durch definierte Substanzen in vitro. Phytopath.Z. 44, 361-380.
- GROSSMANN, F., 1968: Zur Bildung pektischer und zellulolytischer Enzyme durch Phytophthora infestans de By. I. Kultur des Pilzes in einer Nährlösung. Phytopath.Z. 62, 371-382.
- HALLIWELL, G., 1961: The action of cellulolytic enzymes of Myrothecium verrucaria. Biochem.J. 79, 185-192.
- HALLIWELL, G., 1962: The breakdown of cellulose and its derivatives by enzymes from Myrothecium verrucaria. Biochem.J. 85, 67-72.

- HALLIWELL, G., 1963: Measurement of cellulase and factors affecting its activity. In: E.T.REESE: Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials. Symp.publ.Div. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris.
- HALLIWELL, G., 1965: Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. Biochem.J. 95, 270-281.
- HAMMERSTROM, R.A., K.D. CLAUS, J.W. COGHLAN and R.H. McBEE, 1955: The constitutive nature of bacterial cellulases. Archs Biochem.Biophys. 56, 123-129.
- HANCOCK, J.G., 1965: Relationship between induced changes in pH and production of polygalacturonate transeliminase by Colletotrichum trifolii. Phytopathology 55, 1061.
- HARTZ, P., 1969: Die Anfälligkeit verschiedener Gramineen gegen Cercospora herpotrichoides Frön im Hinblick auf die Fruchtfolgezusammenhänge bei der Halmbruchkrankheit des Weizens. Mitt.biol.BundAnst.Ld-u.Forstw. Heft 135.
- HASH, J.H., and K.W. KING, 1958: On the nature of the β -glucosidases of Myrothecium verrucaria. J.biol.Chem. 232, 381-393.
- HEINEN, W., und J.v.d.BRAND, 1963: Enzymatische Aspekte zur Biosynthese des Blatt-Cutins bei Gasteria verrucosa-Blättern nach Verletzung. Z.Naturf. 18, 67-79.
- HENGLEIN, F.A., 1958: Die Uron- und Polyuronsäuren (Pektin und Alginsäure). In: W. RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VI, 405-478. Springer-Verlag, Berlin usw.
- HEYN, A.N.J., 1966: The microcrystalline structure of cellulose in cell walls of cotton, ramie, and jute fibers as revealed by negative staining of sections. J.Cell Biol. 29, 181-197.
- HORTON, J.C., and N.T. KEEN, 1964: Glucose inhibition of cellulase synthesis by Pyrenochaeta terrestris. Iowa St.J.Sci. 71, 88-91.
- HORTON, J.C., and N.T.KEEN, 1966: Sugar repression of endopolygalacturonase and cellulase synthesis during pathogenesis by Pyrenochaeta terrestris as a resistance mechanism in onion pink root. Phytopathology 56, 908-916.
- HULME, M.A., and D.W. STRANKS, 1970: Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. Nature, Lond. 226, 469-470.
- HUSAIN, A., and A. KELMAN, 1959: Tissue is disintegrated. In: J.G. HORSFALL and A. DIMOND: Plant Pathology, Vol.I, 143-188, Academic Press, New York and London.

- HUSAIN, A., and A.E. DIMOND, 1960: Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. *Phytopathology* 50, 329-331.
- JOSLYN, A.M., 1962: The chemistry of protopectin: a critical review of historical data and recent developments. *Adv.Fd Res.* 11, 1-107.
- JURÁSEK, L., J.R. COLVIN and D.R. WHITAKER, 1967: Microbiological aspects of the formation and degradation of cellulosic fibers. *Adv.appl.Microbiol.* 9, 131-170.
- KERTESZ, Z.I., 1955: Pectic enzymes. In: S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (Eds.): *Methods in Enzymology*. Vol.I, 158-166. Academic Press, New York.
- KERTESZ, Z.I., and R.J. MCCOLLOCH, 1950: Enzymes acting on pectic substances. *Adv. in Carbohydrat Chem.* 5, 79-102.
- KOLLER, A., and H. NEUKOM, 1964: Detection of oligogalacturonic acids by thin-layer chromatography. *Biochim.biophys.Acta* 83, 366-367.
- KRAMER, P.J., 1955: Physical chemistry of the vacuoles. In: W. RUHLAND: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd.I, 649-660. Springer-Verlag, Berlin usw.
- LANGE-DE LA CAMP, M., 1966a: Die Wirkungsweise von *Cercospora herpotrichoides* Fron, dem Erreger der Halmbrüchkrankheit des Getreides. I. Feststellung der Krankheit. Beschaffenheit und Infektionsweise ihres Erregers. *Phytopath.Z.* 55, 34-66.
- LANGE-DE LA CAMP, M., 1966b: Die Wirkungsweise von *Cercospora herpotrichoides* Fron, dem Erreger der Halmbrüchkrankheit des Getreides. II. Aggressivität des Erregers. *Phytopath.Z.* 56, 155-190.
- LANGE-DE LA CAMP, M., 1966c: Die Wirkungsweise von *Cercospora herpotrichoides* Fron, dem Erreger der Halmbrüchkrankheit des Getreides. III. Art und Ausmaß des Schadens. Bekämpfungsmöglichkeiten. *Phytopath.Z.* 56, 363-392.
- LANGE-DE LA CAMP, M., 1967: Der Einfluß der Temperatur auf den Befall mit *Cercospora herpotrichoides* Fron. *Z.PflKrankh.PflPath.PflSchutz* 74, 267-276.
- LI, L.H., R.M. FLORA and K.W. KING, 1965: Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Archs Biochem.Biophys.* 111, 439-447.
- LYR, H., 1959: Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. I. Mitteilung. Pectin als C-Quelle. *Arch.Mikrobiol.* 33, 266-282.
- LYR, H., 1964: Alterung und Enzymbildung bei höheren Pilzen. *Z.allg.Mikrobiol.* 4, 249-258.

- LYR, H., und L. SCHÄNEL, 1964: Über die Cellulase-Bildung von Fomes marginatus Gill. Z.allg.Mikrobiol. 4, 341-349.
- MacMILLAN, J.D., and R.H. VAUGHN, 1964: Purification and properties of a polygalacturonic acid-trans-eliminase produced by Clostridium multi-fermentans. Biochemistry 3, 564-572.
- MADER, H., 1958: Cutin. In: W. RUHLAND: Handbuch der Pflanzen-physiologie. Bd.X, 270-281. Springer-Verlag, Berlin usw.
- MANDELS, G.R., 1950: The photoinactivation of enzymes by riboflavin. Plant Physiol. 25, 763-766.
- MANDELS, M., and E.T. REESE, 1960: Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J.Bact. 79, 816-826.
- MANDELS, M., and E.T. REESE, 1963: Inhibition of cellulases and β -glucosidases. In: E.T.REESE: Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials. pp.115-158. Symp.publ.Div.Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris.
- MANLEY, R.S.J., 1964: Fine structure of native cellulose microfibrils. Nature, Lond. 204, 1055-1057.
- MARAITE, H., et J.A. MEYER, 1968: Production de la pectine-transeliminase par Fusarium oxysporum f.sp. melonis sur des milieux de cultures. Médec.Rijksfac.Land.wetensch.Gent, 33, 1141-1150.
- MARTIN, J., 1967: Über die Hemmung pektischer und zellulolytischer Enzyme von Rhizoctonia solani Kühn und den Einfluß einiger Hemmstoffe auf den Krankheitsprozeß. Diss.Gießen.
- MARTIN, J.T., and B.E. JUNIPER, 1970: The cuticles of plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd. Edinburgh.
- MARX-FIGINI, M., und G.V. SCHULZ, 1966: Zur Biosynthese der Cellulose. Naturwissenschaften 53, 466-474.
- MAYER, J.A., E.D. GARBER and S.G. SHAEFFER, 1964: Effects of buffers on the pectolytic activity of culture filtrates of Fusarium oxysporum. Nature, Lond. 202, 414-415.
- McCLENDON, J.H., 1964: Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes. Am.J.Bot. 51, 628-633.
- McCOLLOCH, R.J., and Z.I. KERTESZ, 1947: Pectic enzymes. VIII. A comparison of fungal pectin-methyl-esterase with that of higher plants, especially tomatoes. Arch.Biochem. 13, 217-229.
- MIELKE, H., 1970: Befallstoleranz und Halmbruchresistenz verschiedener Weizensorten gegen Cercospora herpotrichoides Fron. Z.PflZücht. 64, 248-288.

- MILLER, G.L., and R. BLUM, 1956: Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis. *J.biol.Chem.* 218, 131-137.
- MILLER, G.L., R. BLUM and N.F. HAMILTON, 1960: Further studies on the resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis. *J.Chromat.* 3, 576-581.
- MOHR, H., 1969: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- MÜLLER, J., und H. MELCHINGER, 1964: Methoden der Mikrobiologie. Kosmos-Gesellschaft der Naturfreunde. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- NAGEL, C.W., and R.H. VAUGHN, 1961: The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Archs Biochem.Biophys.* 93, 344-352.
- NELSON, N., 1944: A photometric adaptation on the SOMOGYI method for the determination of glucose. *J.biol.Chem.* 153, 375-380.
- NEUKOM, H., 1960: Über Farbreaktionen von Uronsäuren mit Thiobarbitursäure. *Chimia* 14, 165-167.
- NORKRANS, B., 1963a: Degradation of cellulose. *A.Rev.Phytopath.* 1, 325-350.
- NORKRANS, B., 1963b: Influence of some cultural conditions on fungal cellulase production. *Physiologia Pl.* 16, 11-19.
- NORKRANS, B., 1967: Cellulose and cellulolysis. *Adv.appl. Microbiol.* 9, 91-130.
- NORKRANS, B., and K. ASCHAN, 1953: A study in the cellulolytic variation for wildtypes and mutants of *Collybia velutipes*. II. Relations to different nutrient media. *Physiologia Pl.* 6, 829-836.
- PAGE, O.T., 1961: Quantitative paper chromatographic techniques for the assay of products of polygalacturonase activity of fungus cultures. *Phytopathology* 51, 337-338.
- PANDEY, D.K., and S.C. GUPTA, 1966: Studies in pectic enzymes of parasitic fungi. VI. Factors affecting the secretion of pectic enzymes by *Alternaria tenuis*. *Biologia Pl.* 8, 131-141.
- PETERSSON, G., and L. ANDERSSON, 1968: Influence of hydrogen ions on the stability and structure of a cellulase from *Penicillium notatum*. *Archs Biochem.Biophys.* 123, 497-503.
- PETERSSON, G., E.B. COWLING and J. PORATH, 1963: Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low-molecular-weight cellulase from *Polyporus versicolor*. *Biochim.biophys.Acta* 67, 1-8.
- PETERSSON, G., and J. PORATH, 1963: Studies on cellulolytic enzymes. II. Multiplicity of cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochim.biophys.Acta* 67, 9-15.

- RANBY, B.G., 1958: Cellulosen und ähnliche Wandsubstanzen von Kohlenhydratnatur, z.B. Hemicellulosen (Struktur, Eigenschaften und Verbreitung). In: W.RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Bd.VI, 268-304. Springer-Verlag, Berlin usw.
- REESE, E.T., 1959: Cellulose decomposition: Fungi. Marine boring and fouling organisms. Friday Harbor Symposia.
- REESE, E.T., and M. MANDELS, 1963: Enzymatic hydrolysis of β -glucans. In: E.T.REESE: Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials. pp. 197-234. Symp.publ.Div.Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris.
- REESE, E.T., R.G.H. SIU and H.S. LEVINSON, 1950: The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J.Bact. 59, 485-497.
- ROELOFSEN, P.A., 1965: Ultrastructure of the wall in growing cells and its relation to the direction of the growth. Adv.Bot.Res. 2, 69-149.
- SCHULZ, F.A., 1967: Untersuchungen über den Einfluß der Gründung auf die Halmbruchkrankheit des Weizens und ihren Erreger Cercospora herpotrichoides Fron. Diss. Gießen.
- SELBY, K., and C.C. MAITLAND, 1967a: The cellulase of Trichoderma viride. Biochem.J. 104, 716-724.
- SELBY, K., and C.C. MAITLAND, 1967b: Components of Trichoderma viride cellulase. Archs Biochem. Biophys. 118, 254-257.
- SELBY, K., C.C. MAITLAND and K.V.A. THOMPSON, 1963: The degradation of cotton cellulose by the extracellular cellulase of Myrothecium verrucaria. Biochem.J. 88, 288-296.
- SHERWOOD, R.T., 1966: Pectin lyase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani and other fungi. Phytopathology 56, 279-286.
- SHERWOOD, R.T., and A. KELMAN, 1964: Measurement of pectinolytic and cellulolytic enzyme activity by rotating spindle viscometry. Phytopathology 54, 110-112.
- SINGH, G.P., and A. HUSAIN, 1964: Relation of hydrolytic enzyme activity with the virulence of strains of Colletotrichum falcatum. Phytopathology 54, 1100-1101.
- STARR, M.P., and F. MORAN, 1962: Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. Science, N.Y. 135, 920-921.
- SUZUKI, H., T. ABE, M. URABE, K. NISIZAWA and A. KURODA, 1967: Nature of the macerating enzymes from Rhizopus sp. J.Ferment.Technol. 45, 73-85.

- TURNER, M.T., and D.F. BATEMAN, 1968: Maceration of plant tissues susceptible and resistant to soft-rot pathogens by enzymes from compatible host-pathogen combinations. *Phytopathology* 58, 1509-1515.
- VÁRADI, J., and L. JURÁŠEK, 1970: Cellulase and xylanase of fungus Schizophyllum commune. II. Submerged cultivation on a rotary shaker and vibrating equipment. *Drevársky Výskum Zväzok* 1, 7-13.
- WÄLCHLI, O., 1968: Einfluß des sichtbaren Lichtes auf den Abbau von Cellulose durch Pilze. *Mater.& Org.* 3, 245-256.
- WHITNEY, P., J.M. CHAPMAN and J.B. HEALE, 1969: Carboxymethylcellulase production by Verticillium albo-atrum. *J.gen.Microbiol.* 56, 215-225.
- WINSTEAD, N.N., and J.C. WALKER, 1954: Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. *Phytopathology* 44, 153-158.
- WOOD, R.K.S., 1960: Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. *A.Rev.Pl.Physiol.* 11, 299-322.
- WOOD, T.M., 1968: Cellulolytic enzyme system of Trichoderma koningii. *Biochem.J.* 109, 217-227.
- WOOD, T.M., and D.R. PHILLIPS, 1969: Another source of cellulase. *Nature, Lond.* 222, 986-987.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.F.Großmann für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftlichen Anleitungen sowie für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr.G.Menke, dessen große Hilfsbereitschaft die Durchführung der Arbeit erleichterte, herzlich danken; ferner auch allen Institutsangehörigen für ihr freundlichen Entgegenkommen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

- 29.8.1940: geboren als Sohn des Gutsverwalters
David Hänßler und seiner Ehefrau Marie, geb.
Dönges, in Langenselbold, Kreis Hanau.
- 1947-1952: Besuch der Volksschule in Mauswinkel
- 1952-1958: Besuch der Realschule in Birstein und
Gelnhausen
- 1958: Mittlere Reife
- 1958-1962: Besuch des Aufbaugymnasiums in Schlüchtern
- 1962: Reifeprüfung
- 1962-1963: Landwirtschaftslehre auf dem Betrieb von
Herrn Richard Westernacher in Lindheim,
Kreis Büdingen
- 1963: Landwirtschaftliche Gehilfenprüfung
- 1963-1967: Studium der Landwirtschaft an der
Universität Gießen sowie der Technischen
Hochschule München/Weihenstephan
- 1967: Diplomprüfung in Gießen
- 1968-1971: Anfertigung der vorliegenden Arbeit

